

Alexandre Geraldo

**EFEITO DO CONSUMO DE PROBIOTICOS SOBRE TÍTULO
DE ANTICORPOS DO SISTEMA ABO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia na Área de concentração Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Flávia Martinello

Florianópolis,
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

GERALDO, ALEXANDRE

EFEITO DO CONSUMO DE PROBIOTICOS SOBRE TÍTULO DE
ANTICORPOS DO SISTEMA ABO / ALEXANDRE GERALDO ;
orientadora, FLÁVIA MARTINELLO - Florianópolis, SC, 2013.
127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Hemolisinas ABO. 3. Anticorpos ABO. 4.
Bifidobactérias. 5. Probióticos. I. MARTINELLO, FLÁVIA. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

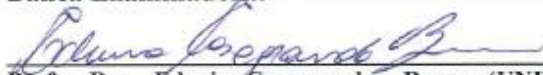
**“EFEITO DO CONSUMO DE PROBIÓTICOS
SOBRE O TÍTULO DE ANTICORPOS DO SISTEMA
ABO”**

POR

Alexandre Geraldo

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Edneia Casagrandra Bueno (UNIVALI – Membro
Titular)



Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Maria Lourdes Barjas-Castro (UNICAMP – Membro
Titular)



Profa. Dra. Flávia Martinello (UFSC – Orientadora)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 12 de março de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

À Deus, pela proteção em minha vida.

À minha esposa Ana Carolina Osika, pelo amor, compreensão e paciência nos momentos de ausência.

À minha mãe Teresinha Zimmermann, pelo carinho e ajuda em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã Cristiane Geraldo, pela educação e exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra Flávia Martinello, por aceitar esse desafio e pela excelência de sua orientação, ajudando a superar as dificuldades, compartilhando e celebrando as conquistas. Obrigado pelas oportunidades e conselhos.

À minha mãe Teresinha Zimmermann, pelas inúmeras vezes em que pode se disponibilizar em auxiliar no desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos Dr. Rodolfo João Ramos e Everaldo José Schörrner pelo apoio e incentivo desse trabalho.

À Rosana Richter e Dr. Delson Morilo Langaro pelo suporte nos momentos de minha ausência.

Aos colaboradores do Hemocentro Regional de Blumenau pelo apoio e cooperação dessa conquista.

Aos alunos de iniciação científica, voluntários e estagiários pela dedicação inclusive nos finais de semana e feriados.

Aos voluntários que se dedicaram e acreditaram na importância desse estudo.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC), Fundação de Apoio ao HEMOSC e CEPON (FAHECE) e Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo apoio logístico e incentivo para a execução dessa obra.

À Indústria de Alimentos Cooperativa Agropecuária Petrópolis LTDA - PIÁ, de Nova Petrópolis-RS, em especial Fabiane Cristina Sehnem, pelo pronto atendimento e fornecimento dos iogurtes probióticos.

À Bio-rad®, em especial Alexandre Seib e Ana Cláudia Peron pelo apoio e fornecimento dos reagentes imuno-hematológicos.

A todos que de alguma maneira cooperaram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho, para sempre, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O intestino possui uma grande diversidade microbiana e parte desta é responsável por estimular os anticorpos do Sistema ABO. Pacientes que possuem anticorpos anti-ABO no plasma podem apresentar uma diminuição da concentração plaquetária após a transfusão de plaquetas ABO não compatível, assim como hemólise de eritrócitos (incompatibilidade menor). Essa atividade hemolítica pode ser detectada através da titulação de anticorpos ABO ou através de testes de hemólise (Pesquisa de Hemolisina). Há inúmeros relatos de reações transfusionais ocasionadas por transfusões de hemocomponentes não isogrupo, destacando-se um que apontou como provável causa do aumento de títulos de anticorpos anti-ABO o uso de cápsulas de probióticos pelo doador. Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo clínico para avaliar o efeito do consumo de iogurte probiótico sobre os títulos de anticorpos contra antígenos ABO de voluntários correlacionando-os com a concentração fecal de bifidobactérias. Participaram do estudo 126 voluntários que consumiram diariamente uma unidade de iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* pelo período de 30 dias. Antes e após o consumo do probiótico foram analisados os títulos de anticorpos anti-ABO, os resultados da Pesquisa de Hemolisina ABO, o pH e a concentração de bifidobactérias fecais. Entre os voluntários foi observada a frequência dos fenótipos ABO na proporção de 45% (57) do Grupo A, 9% (11) do Grupo B e 46% (58) do Grupo O. O percentual de amostras consideradas com altos títulos de anticorpos ABO em temperatura ambiente (TA) e em presença de antiglobulina humana (AGH) foi de 32,5% e 40,5% respectivamente, antes do consumo do iogurte. Após o consumo do probiótico os títulos aumentaram para 34,9% e 50,8%, respectivamente. Após o consumo do iogurte foi observada relação significativa entre a idade dos voluntários e o título de anticorpos Anti-B somente em TA, sendo que não houve relação significativa com anticorpos Anti-A. Os resultados sugerem que o uso de probióticos por indivíduos com mais de 40 anos pode manter elevado o título de anticorpos ABO. Após o consumo do iogurte contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* evidenciou-se que os títulos Anti-B em TA reduziram e os títulos de Anti-A em AGH aumentaram significativamente. Também foi observada relação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o título de anticorpos Anti-B em AGH após o consumo de probióticos. No entanto, não foi evidenciada relação

significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o pH fecal antes ou após o consumo do probiótico. Evidenciamos que 65,1% das amostras não apresentaram alteração nos resultados de hemolisina, 29,4% passaram a ser consideradas Hemolisina Positiva e 5,6% passaram ser consideradas Hemolisina Negativa após o consumo de probióticos. Nossos resultados sugerem que a mudança alimentar da sociedade (como o aumento no consumo de produtos probióticos) possa influenciar na frequência de altos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO. Assim, consequentemente, pode ocorrer uma diminuição dos hemocomponentes disponíveis para transfusão não isogrupo nas instituições hemoterápicas.

Palavras-chave: Hemolisinas ABO, Anticorpos ABO, Bifidobactérias, Probióticos.

ABSTRACT

Intestine has a large microbial diversity that is responsible for stimulates antibodies against ABO system. Patients with plasmatic ABO antibodies may exhibit a decreased platelet concentration after platelet transfusion ABO-mismatched, as well as hemolysis of erythrocytes (ABO-minor-mismatch). This hemolytic activity can be detected by titration of ABO antibodies or by hemolysis test (Hemolysin Test). There are numerous reports of transfusion reactions caused by transfusions of blood products ABO-mismatched. One study pointed out the probable cause of increased titer of ABO antibodies after use of probiotics capsules of by the donor. In this context, the aim of this study was to perform a clinical study to evaluate the effect of probiotic yoghurt consumption on antibody titers against ABO antigens correlating them with fecal bifidobacteria. The study included 126 volunteers who consumed a daily unit of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* for 30 days. Before and after probiotic consumption it were analyzed the titers of anti-ABO, the results of ABO hemolysin, fecal pH and concentration of bifidobacteria. Among volunteers, it was observed the frequency of ABO phenotype of 45% (57) from A Group, 9% (11) of B Group and 46% (58) of O Group. The percentage of samples considered with high titers of antibodies ABO at ambient temperature (AT) and in presence of human antiglobulin (AGH) was 32.5% and 40.5%, respectively, before the consumption of yoghurt. After consumption of probiotic the titers increased to 34.9% and 50.8%, respectively. After consumption of yoghurt it was observed a significant association between the age of volunteers and the titer of Anti-B antibodies only in TA, and there was no significant relationship with Anti-A antibodies. The results suggest that the use of probiotics for individuals over than 40 years old can maintain a high antibody titer ABO. After consumption of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* it was observed that the titers of Anti-B in TA reduced and Anti-A titers in AGH increased significantly. Was also a significant association between the amount of bifidobacteria and the titer of Anti-B antibodies at AGH after consumption of probiotics. However, no correlation was observed between the amount of fecal bifidobacteria and pH before or after consumption of probiotic. It was demonstrated that 65.1% of the samples had no change in the results of hemolysin, 29.4% became considered Hemolysin Positive and 5.6% became Hemolysin Negative after consumption of probiotics. Our

findings suggest that the dietary change of society (such as the increase in the consumption of probiotics) may influence the frequency of high titers of antibodies against antigens of ABO system. So, consequently, there may be a decrease in blood components available for isogroup transfusion at institutions of hemotherapy.

KEYWORDS: ABO Hemolysins, ABO antibodies, Bifidobacteria, Probiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxa de reações transfusionais para cada mil hemocomponentes transfundidos, segundo o tipo de hemocomponente.....	31
Figura 2	Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação em Temperatura Ambiente das amostras na Fase I.....	52
Figura 3	Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana das amostras na Fase I.....	53
Figura 4	Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação em Temperatura Ambiente na Fase I de acordo com a idade.....	55
Figura 5	Figura 5 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana na Fase I de acordo com a idade.....	55
Figura 6	Distribuição do percentual de resultados da Pesquisa de Hemolisina A e B na Fase I.....	56
Figura 7	Correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase I.....	58
Figura 8	Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação em Temperatura Ambiente das amostras na Fase II.....	59

Figura 9	Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana das amostras na Fase II.....	60
Figura 10	Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação em Temperatura Ambiente na Fase II de acordo com a idade.....	61
Figura 11	Figura 11 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana na Fase II de acordo com a idade.....	61
Figura 12	Distribuição percentual de resultados com Pesquisa de Hemolisina A e B na Fase II.....	62
Figura 13	Correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase II.....	63
Figura 14	Distribuição das amostras quanto ao comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO analisados na Fase II (quarentena) em relação à Fase I.....	64
Figura 15	Comportamento dos resultados da Pesquisa de Hemolisina na Fase II (quarentena) em relação à Fase I.....	65
Figura 16	Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação em Temperatura Ambiente das amostras na Fase III.....	67

Figura 17	Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana das amostras na Fase III.....	68
Figura 18	Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação em Temperatura Ambiente na Fase III de acordo com a idade.....	70
Figura 19	Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana na Fase III de acordo com a idade.....	70
Figura 20	Distribuição percentual de resultados com Pesquisa de Hemolisina A e B na Fase III.....	71
Figura 21	Correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase III.....	72
Figura 22	Distribuição das amostras quanto ao comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO analisados e Fase III em relação à Fase I.....	74
Figura 23	Comportamento dos resultados da Pesquisa de Hemolisina na Fase III em relação à Fase I.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Transfusões realizadas, reações transfusionais esperadas, reações transfusionais notificadas e subnotificação estimada em Santa Catarina e no Brasil no período de 2007 a 2010.....	30
Tabela 2	Causas e frequência de óbitos atribuídos à transfusão sanguínea, segundo diagnóstico da reação transfusional e o ano de ocorrência entre 2007 e 2011.....	32
Tabela 3	Percentual de amostras consideradas críticas de acordo com os diferentes títulos críticos na Fase I.....	54
Tabela 4	Concordância entre os resultados da Pesquisa de Hemolisina e títulos de anticorpos do Sistema ABO.....	57
Tabela 5	Comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO na Fase II (quarentena) em relação à Fase I.....	64
Tabela 6	Intensidade de variação dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados em TA e AGH na Fase II em relação à Fase.....	66
Tabela 7	Percentual de amostras consideradas críticas de acordo com os diferentes títulos críticos na Fase III.....	69
Tabela 8	Comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO na Fase III em relação à Fase I.....	73
Tabela 9	Intensidade de variação dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados em TA e AGH na Fase III em relação à Fase I.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABH - Antígenos do Sistema ABO, Hh e Lewis
AGH - Antiglobulina Humana
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD –Grupamento de Diferenciação
CH - Concentrado de Hemácias
CP - Concentrado de Plaquetas
CRIO - Crioprecipitado
DTT - Ditioneitol
dL- Decilitro
EDTA –Ácido Etileno Diamino Tetracético
EUA - Estados Unidos da América
g - Gramas
Gal - Galactose
Glc - Glucose
Grupo A - Fenótipo A do Sistema ABO
Grupo B - Fenótipo B do Sistema ABO
Grupo O - Fenótipo O do Sistema ABO
HA - Identificação do tubo para Pesquisa de Hemolisina A ou titulação de anticorpos anti-A
HB - Identificação do tubo para Pesquisa de Hemolisina B ou titulação de anticorpos anti-B
IgA - Imunoglobulina A
IgG - Imunoglobulina G
IgE - Imunoglobulina E
IgM - Imunoglobulina M
L - Litro
LDH - Lactato desidrogenase
M – Molar
MBL –Lectina Ligante de Manose
mg - Miligrama
mL – Mililitro
N - Normal
NAc - n-Acetil
NOTIVISA - Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada
RhD - Antígeno D do Sistema RH
rpm - Rotação por Minuto
ST - Sangue Total

TA - Temperatura Ambiente

TRALI –Lesão Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão

PFC - Plasma Fresco Congelado

pH - Potencial de Hidrogênio

RCA – Ágar Clostridial Reforçado

UFC - Unidade Formadora de Colônias

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

μL- Microlitros

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1	Introdução do Estudo e Justificativa	23
2	Introdução	25
2.1.	História	25
2.2.	Genética	25
2.3.	Hemovigilância.....	26
2.4.	Desenvolvimento dos anticorpos do Sistema ABO	33
2.5.	Hemolisina e anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em altos Títulos	33
2.6.	Anticorpos do Sistema ABO e Bactérias	34
2.7.	Probióticos	37
2.8.	Probióticos e o Sistema Imune.....	38
3	Objetivos.....	39
3.1.	Objetivos Gerais:	39
3.2.	Objetivos Específicos:	39
4	Materiais e Métodos.....	41
4.1.	Delineamento do estudo.....	41
4.2.	CrITÉrios de Exclusão	42
4.3.	Fenotipagem ABO e Pesquisa de Anticorpos Irregulares.....	43
4.4.	Pesquisa de Hemolisinas A e B	44
4.5.	Determinação dos títulos de anticorpos anti-A e anti-B	45
4.6.	Determinação do conteúdo de bifidobactÉrias e pH fecal.....	47
4.7.	Determinação do conteúdo de bifidobactÉrias e pH do iogurte	48
4.8.	Análise estatística	49
5	Resultados.....	51
5.1.	Fase I.....	51
5.1.1.	Título de Anticorpos do Sistema ABO.....	51
5.1.2.	Pesquisa de Hemolisinas ABO.....	55

5.1.3.Comparação entre o título de anticorpos do Sistema ABO e o resultado de hemolisina.....	56
5.1.4.Bifidobactérias e pH fecal.....	57
5.2. Fase II.....	58
5.2.1.Título de Anticorpos do Sistema ABO.....	58
5.2.2.Pesquisa de Hemolisinas ABO.....	61
5.2.3.Bifidobactérias e pH fecal.....	62
5.2.4.Comparação dos resultados da Fase II em relação à Fase I.....	63
5.2.5.Pesquisa de Hemolisinas ABO.....	65
5.2.6.Bifidobactérias e pH fecal da Fase II em relação a Fase I.....	66
5.3. Fase III.....	66
5.3.1.Análise do Iogurte.....	66
5.3.2.Título de Anticorpos do Sistema ABO.....	67
5.3.3.Pesquisa de Hemolisinas ABO.....	70
5.3.4.Bifidobactérias e pH fecal.....	71
5.3.5.Comparação dos resultados da Fase III em relação à Fase I.....	72
5.3.6.Pesquisa de Hemolisinas ABO.....	74
5.3.7.Bifidobactérias e pH fecal da Fase III em relação a Fase I.....	76
6 Discussão.....	77
7 Conclusões.....	101
8 Bibliografia.....	103
9 Apêndice 1.....	115
10 Apêndice 2.....	117
11 Apêndice 3.....	121
12 Anexo 1	125

1 INTRODUÇÃO DO ESTUDO E JUSTIFICATIVA

A RDC/ANVISA 153 de 2004 preconizava, na entrevista para a doação de sangue, o questionamento sobre cirurgias anteriores, doenças prévias, comportamento sexual, uso de drogas, medicamentos e outros aspectos que visavam buscar informações para que o sangue doado seja seguro e com qualidade. Nesta legislação constava uma lista de medicamentos que poderiam tornar um doador de sangue inapto definitivamente ou temporariamente. No entanto, não havia nesta lista informação sobre o uso de microbióticos independentemente da formulação. Também na mesma resolução não havia menção à determinação de títulos ABO ou Pesquisa de Hemolisina em doadores de sangue (BRASIL, 2004).

Esta legislação foi revogada e substituída pela RDC/ANVISA 57 em 16 de dezembro de 2010, que determina que as instituições possuam protocolos para testes de hemolisinas. Entretanto, a legislação não especifica em quais casos o protocolo deve ser executado, assim como a metodologia que deve ser utilizada. Em contrassenso, a Portaria 1353 de 2011, publicada pelo Ministério da Saúde em 16 de junho de 2011, na Seção VI (Exames de Qualificação no Sangue de Doador) recomenda a realização do teste de hemolisina para transfusões de plaquetas não isogrupo utilizando-se um método qualitativo com incubação a 37°C. No entanto, esta portaria na Seção X (Da Transfusão Sanguínea) também recomenda avaliar o volume de plasma dos hemocomponentes plaquetários e hemolisinas ABO através de um método semi quantitativo.

Neste contexto, a hipótese do presente estudo é que a utilização de probióticos por doadores de sangue possa elevar o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e, consequentemente, favorecer o desenvolvimento de reações hemolíticas em receptores de sangue.

Caso seja constatado que probióticos são capazes de elevar o título de anticorpos e consequentemente aumentar a atividade hemolítica dos mesmos, as instituições deverão realizar testes de rotina capazes de detectar se os componentes doados possuem anticorpos contra antígenos do Sistema ABO hemolíticos. Isto porque a disponibilidade de produtos contendo probióticos em vários nichos de mercado favorece o acesso da população aos mesmos, o que poderia facilitar que doadores de sangue ao consumirem esses itens desenvolvam anticorpos contra antígenos do Sistema ABO hemolíticos. Caso o teste seja positivo, os

hemocomponentes desses doadores deverão ser transfundidos isogrupos para o Sistema ABO, evitando assim Reações Hemolíticas ou até mesmo óbitos de pacientes por incompatibilidade menor.

Os resultados desse trabalho também serão úteis para a Coordenação Geral da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde, orientando tanto a necessidade ou não da inclusão na legislação quanto a obrigatoriedade de testes capazes de detectar anticorpos contra antígenos do Sistema ABO hemolíticos em amostras de doadores de sangue.

2 INTRODUÇÃO

2.1. História

Desde o século XIX cientistas vêm se preocupando quanto às morbidades decorrentes de transfusões sanguíneas. Autores como Landois, em 1875, já estudavam os efeitos indesejados de transfusões sanguíneas entre animais de diferentes espécies (POLK, 1904). Em 1879 uma tese de doutorado foi publicada no Brasil questionando os riscos e benefícios de seres humanos receberem sangue oriundo de animal (JUNQUEIRA, *et al.*, 2005). Em 1900 foi iniciada a revolução da medicina transfusional com a descoberta dos antígenos eritrocitários do Sistema ABO por Karl Landsteiner, sendo esse o ganhador do Prêmio Nobel em 1930 por sua descoberta (GIRELLO & KÜHN, 2011).

2.2. Genética

Os antígenos do sistema ABO são carboidratos adicionados por glicosiltransferases específicas, codificadas através das informações contidas no locus *ABO*. Para a formação desses antígenos ABO é necessário o gene *FUT1*, por meio do qual o antígeno H (do Sistema Hh) é produzido com auxílio da enzima α -2-L-fucosiltransferase que adiciona uma L-Fucose à uma substância constituinte das hemácias. Através do gene *A*, a enzima N-acetil-galactosaminatransferase adiciona uma N-D-Acetilgalactosamina ao antígeno H formando o fenótipo A e através do gene *B*, a enzima galactosiltransferase adiciona uma D-galactose ao antígeno H gerando o fenótipo B. Quando há atividade das duas enzimas simultaneamente temos a formação do fenótipo AB e quando não há atividade de ambas glicosiltransferases temos o fenótipo O, composto apenas pelo antígeno H (YAMAMOTO, 2004; GIRELLO & KÜHN, 2011; ROBACK *et al.*, 2008; STORRY & OLSSON, 2009).

Os antígenos ABO não estão presentes somente nos eritrócitos, mas também em linfócitos, plaquetas, secreções, mucosas e tecidos, sendo dessa forma antígenos de histocompatibilidade (BORDIN *et al.*, 2007; GIRELLO & KÜHN, 2011; ROBACK *et al.*, 2008). A frequência dos antígenos ABO na população varia de acordo com as características étnicas de cada país. No Brasil, os fenótipos A, B, AB e O são presentes em 39,45%, 11,51%, 2,52% e 46,52% dos caucasianos, respectivamente. Já em mulatos podemos encontrar uma frequência de 29,63%, 13,78%, 3,39% e 53,20%, respectivamente (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

Subgrupos dos antígenos ABO assim como as alterações genéticas que levam a formação dos mesmos vêm sendo estudados. As diferenças moleculares são decorrentes de mutações de ponto únicas, múltiplas, deleções e rearranjo gênicos que por consequência acarretam em alterações dos nucleotídeos. Essas mutações provocam alterações qualitativas e quantitativas dos antígenos eritrocitários ABO como o caso dos antígenos A₂ e A_x (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003; BORDIN *et al.*, 2007; ROBACK *et al.*, 2008; STORRY & OLSSON, 2009).

O gene A₁, considerado o gene selvagem, realiza a conversão de 810 mil a 1,17 milhões de sítios do antígeno H em antígenos A₁ por meio da glicosiltransferase. Já o gene A₂, que tem um nucleotídeo deletado e a substituição de uma Citosina por uma Timina, realiza a conversão de apenas 300 mil sítios do antígeno H em antígenos A₂ (GIRELLO & KÜHN, 2011).

A importância da expressão dos antígenos ABO é estudada principalmente com a finalidade de evitar reações transfusionais e rejeição de transplantes. Estudos demonstram que há uma menor expressão dos antígenos A₂ em plaquetas e no fígado, podendo dessa forma ser realizada sua transfusão e transplante, respectivamente, ABO incompatíveis sem acarretar prejuízo ao paciente (JULMY *et al.*, 2003; SKOGSBERG *et al.*, 2006(a); SKOGSBERG *et al.*, 2006(b); JULMY *et al.*, 2009). Campos e colaboradores (2010) relataram uma transfusão de concentrado de hemácias ABO incompatível, sem o desenvolvimento de reação transfusional grave no receptor. Após a investigação imunohematológica constatou-se que o paciente era B RhD Positivo, com títulos de anti-A 1/16 e que o concentrado de hemácias transfundido era A₂ RhD Positivo. Os autores concluíram que não houve reação transfusional imediata devido à baixa expressão dos antígenos A₂ no concentrado de hemácias e/ou baixo título de anticorpos anti-A no receptor (CAMPOS *et al.*, 2010).

2.3. Hemovigilância

Os incidentes transfusionais ou reações transfusionais são agravos ocorridos durante ou após a transfusão sanguínea e a ela relacionados. A etiologia das reações transfusionais pode estar relacionada a diversos fatores que vão desde reações contra antígenos presentes nos neutrófilos a contaminação bacteriana do sangue transfundido (BRASIL, 2007).

Os incidentes transfusionais podem ser classificados em imediatos ou tardios, de acordo com o tempo decorrido entre a transfusão e a ocorrência da reação (BRASIL, 2007).

A Reação Hemolítica Aguda é aquela que acarreta em destruição dos eritrócitos em até 24 horas após o término da transfusão, ou seja Reação Transfusional Imediata. Já aquelas desencadeadas após 24 horas ao término da transfusão são classificadas como Reações Transfusionais Tardias (BRASIL, 2007; BORDIN *et al.*, 2007).

Os antígenos glicolipídicos e glicoprotéicos ABO fazem desse Sistema o de maior importância transfusional, já que a transfusão de hemocomponentes com incompatibilidade ABO pode resultar em uma reação hemolítica intravascular e acarretar insuficiência renal ou a morte do paciente (BRASIL, 2007; BORDIN *et al.*, 2007).

Reações transfusionais hemolíticas são aquelas em que há diminuição da sobrevivência dos eritrócitos transfundidos no paciente. Com maior frequência, essa destruição ocorre com os eritrócitos de doadores de sangue transfundidos no receptor de sangue. Essa incompatibilidade maior ocorre devido à presença de antígenos eritrocitários do doador, e de anticorpos contra o antígeno eritrocitário correspondente no plasma do receptor. No entanto, em casos de transfusão de plasma, crioprecipitado (hemocomponentes plasmáticos), concentrado de plaquetas e concentrado de plaquetas coletados por aférese (hemocomponentes plaquetários) de doadores contendo anticorpos do Sistema ABO em altos títulos contra os antígenos do receptor, os próprios eritrócitos do paciente podem ser destruídos pela ação desses anticorpos (incompatibilidade menor) quando transfundidos não isogrupo (FUNG *et al.*, 2007; COSECHEN & MONTEIRO, 2008; ROBACK *et al.*, 2008).

Em raras situações de transfusão de concentrado de hemácias não isogrupo, ainda há certa quantidade de plasma presente na bolsa. Sendo assim, se o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO do doador for elevado, o plasma presente nesta bolsa pode desenvolver as reações transfusionais por incompatibilidade menor (BARJAS-CASTRO *et al.*, 2003; COSECHEN & MONTEIRO, 2008).

As reações transfusionais decorrentes da transfusão de hemocomponentes plasmáticos e plaquetários podem ocorrer mesmo com uma pequena quantidade de plasma, como o caso do concentrado de plaquetas que possui cerca de 50mL de plasma/unidade (FUNG, *et al.*, 2007). A vida útil do concentrado de plaquetas é limitada a cinco dias e em situações de necessidade diária desses hemocomponentes é

inevitável a transfusão de concentrado de plaquetas não isogrupo, sendo que a curta validade desses hemocomponentes torna difícil o gerenciamento do estoque das instituições hemoterápicas (COSECHEN & MONTEIRO, 2008; HENRICHES *et al.*, 2012).

Nos Estados Unidos de 10-40% das transfusões de plaquetas são não isogrupo (FRANÇA *et al.*, 2011). Henrichs e colaboradores (2012) num amplo estudo realizado na *University of Rochester no Transfusion Service and Blood Bank* onde são realizadas aproximadamente 65.000 transfusões/ano, durante o período de 2001 a 2009 foram implantados protocolos para a transfusão isogrupo de hemocomponentes plasmáticos. Os autores observaram moderado aumento no desperdício desses hemocomponentes visto que alguns possuem validade de 5 dias apenas. Durante o estudo foi observado uma diminuição no número de reações transfusionais, refratariedade plaquetária e alo-imunização desses pacientes com as transfusões isogrupo.

A incidência desses eventos com incompatibilidade menor é de 1:9000 (FUNG *et al.*, 2007). Entretanto, estudos recentes sugerem que a incompatibilidade menor entre o plasma do doador e os eritrócitos do receptor, como no caso da transfusão de plaquetas não isogrupo, não está associada com as Reações Transfusionais Febris Não Hemolíticas (YAZER *et al.*, 2012). Não obstante, a transfusão de plaquetas e crioprecipitado não isogrupo está associada a uma maior mortalidade e maior tempo de internação de pacientes, quando comparado com grupos que recebem concentrado de plaquetas e crioprecipitado isogrupo (REFAAI *et al.*, 2011).

As principais reações detectadas são as hemolíticas, algumas inclusive fatais. A variação desses títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO que causam a reação é grande, chegando a ser superior a 1/8.000 (HARRIS *et al.*, 2007). A incidência de reações hemolíticas também pode estar relacionada ao tipo de anticorpo envolvido na incompatibilidade menor. Autores sugerem a utilização de Plasma Fresco Congelado do Grupo A (contendo anticorpos anti-B) como segunda opção nos casos de transfusão maciça para hemorragias agudas. Essa condição seria adotada em situações de escassez de Plasma Fresco AB, visto que o título desses hemocomponentes é menor que do Grupo O e B (ISAAC *et al.*, 2011).

Silva e colaboradores (2006) descreveram uma reação hemolítica aguda em uma paciente do grupo A que recebeu seis concentrados de plaquetas do tipo O. Após a reação hemolítica verificou-se que a causa foi a presença de anticorpos anti-A em altos títulos em um dos concentrados de plaquetas sendo que o título deste doador era de 1.024.

Em revisão, Fung e colaboradores (2007) relatam casos de pacientes que apresentaram reações hemolíticas após receber concentrados de plaquetas com títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO que variavam de 1/512 a acima de 1/10240. Nestes relatos a hemoglobina dos pacientes diminuiu bruscamente (como de 14 g/dL para 8 g/dL). Além disso, alguns pacientes apresentaram sintomas como dispneia e calafrios. Estes autores relataram reação hemolítica e falência renal devido aos altos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO presentes na transfusão de 200 mL de plaquetas por aférese em uma criança. Outra criança de 2,5 anos não sobreviveu ao receber um concentrado de plaquetas por aférese com anti-A com título de 1/32.000, sendo que a hemoglobina passou de 11,5 g/dL para 5,7 g/dL (FUNG *et al.*, 2007). Valbonesi e colaboradores (2000) e Angiolillo e colaboradores (2004), *apud* Harris e colaboradores (2007) também relataram casos de crianças que foram a óbito ao receber concentrado de plaquetas que possuíam altos títulos de anti-A.

A importância de títulos elevados de anticorpos do Sistema ABO não se restringe somente à transfusão de hemocomponentes, mas também aos transplantes de órgãos ABO incompatíveis (KOBAYASHI & SAITO, 2006; SKOGSBERG *et al.*, 2006(a); SKOGSBERG *et al.*, 2006(b); WILPERT *et al.*, 2007). Neste contexto, Tasaki e colaboradores (2003) descreveram o caso de um paciente de 53 anos tipo sanguíneo O RhD Positivo que possuía anti-A de classes IgM e IgG com títulos de 1/64 e 1/1024, respectivamente. Após receber um transplante de medula óssea tipo A RhD Positivo, os autores associaram a demora na resposta ao transplante aos anticorpos anti-A presentes em altos títulos neste paciente.

Como anteriormente mencionado, os antígenos ABO também estão presentes nas plaquetas. Pacientes que possuem altos títulos de anticorpos anti-A; -B e/ou -AB ao receber transfusão de concentrado de plaquetas que contem os respectivos antígenos ABO podem ter uma diminuição na recuperação plaquetária pós-transfusão. Essa diminuição ocorre devido a presença de anticorpos do Sistema ABO do próprio receptor que reconhecem os antígenos ABO presentes nas plaquetas do doador removendo-as da circulação e consequentemente diminuindo a recuperação plaquetária do paciente (JULMY *et al.*, 2003; FUNG *et al.*, 2007; JULMY *et al.*, 2009).

A incidência de Reações Hemolíticas no Brasil não pode ser determinada com exatidão devido ao grande número de subnotificações (BRASIL, 2009(a); BRASIL, 2012). Embora o número de transfusões

no Brasil em 2010 tenha reduzido, segundo o 4º Boletim de Hemovigilância de 2011, é possível verificar o crescente número de notificações dessas reações transfusionais (Tabela 1). Em 2011 o número de transfusões foi superior ao de 2010 (BRASIL, 2011(b); BRASIL, 2012).

Tabela 1. Transfusões realizadas, reações transfusionais esperadas, reações transfusionais notificadas e subnotificação estimada em Santa Catarina e no Brasil no período de 2007 a 2010.

	2007	2008	2009	2010
Nº de Transfusões Realizadas no Brasil	4.002.417	3.314.059	3.616.285	3.465.172
Nº de Transfusões Realizadas em SC	122.549	142.743	110.477	126.610
Nº de Reações esperadas no Brasil	12.007	9.951	10878	10.396
Nº de Reações esperadas em SC	368	429	331	380
Nº de Reações Notificadas no Brasil	2.210	2.613	3.671	4.242
Nº de Reações Notificadas em SC	132	82	287	285
Subnotificação estimada no Brasil (Percentual)	81,6	76,0	66,3	59,2
Subnotificação estimada em SC (Percentual)	64,1	80,9	13,4	25,0

Fonte: Boletim de Hemovigilância nº 4 - ANVISA, 2011

Em 2010 foram realizadas 3.465.172 transfusões sanguíneas no Brasil e o Sistema de Notificações em Vigilância Sanitária - NOTIVISA

registrou 4.597 eventos adversos na Hemovigilância. Destes 2,5% foram classificados em Grau III (ameaça à vida imediata, sem óbito) e em 2008 este percentual era de 3,3%. Em 2010 foram registradas 6 (0,1%) Reações transfusionais de Grau IV (óbito devido à reação transfusional), sendo que em 2008 este número era de 8 (0,3%). O concentrado de hemácias foi responsável por aproximadamente 70% de todas as reações notificadas, o concentrado de plaquetas por 20% e o plasma por 5% das reações em 2008. O percentual de subnotificação no Brasil em 2008 foi de aproximadamente 66,3% e em 2010 foi de 59,2%. No entanto, em algumas regiões do país houve 100% de subnotificações (BRASIL, 2009(a); BRASIL, 2011(b)).

A taxa de reações transfusionais para cada mil hemocomponentes transfundidos em 2008 e 2009 é apresentada na Figura 1.

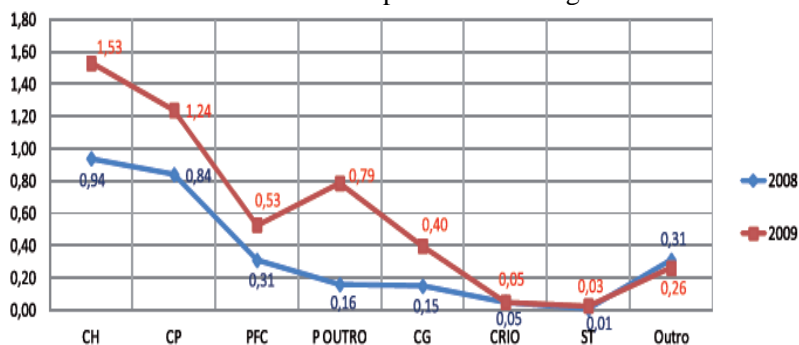


Figura 1: Taxa de reações transfusionais para cada mil hemocomponentes transfundidos, segundo o tipo de hemocomponente (BRASIL, 2011 (b)). Fonte: Boletim de Hemovigilância n° 4 ANVISA, 2011. Legenda: CH – Concentrado de Hemácias; CP – Concentrado de Plaquetas; PFC – Plasma Fresco Congelado; P Outro – Plasma Outro Tipo; CG – Concentrado de Granulócitos; CRIO – Crioprecipitado; ST – Sangue Total.

Os óbitos relacionados à transfusões de sangue ocorridos no período entre 2007 a 2011 são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Causa e frequência de óbitos atribuídos à transfusão sanguínea, segundo diagnóstico da reação transfusional e o ano de ocorrência entre 2007 e 2011.

Causa do óbito	2007	2008	2009	2010	2011	Total
Reação Febril não Hemolítica		1	1			2
Doença transmissível	1					1
Sobrecarga Volêmica			1	2	1	4
Reação Hemolítica Aguda Imunológica	1		2	1	1	5
Contaminação bacteriana		1				1
Reação Alérgica		1				1
TRALI					1	1
Outras imediatas	1		1		3	5

TRALI: *Transfusion related acute lung injury*. Fonte: Boletim de Hemovigilância nº 5 - ANVISA, 2012

A incidência das reações transfusionais no mundo varia entre 1:3.880 a 1:35.000. Para as Reações Hemolíticas Agudas a incidência é maior (1:38.000 a 1:70.000), sendo que os óbitos por incompatibilidade ABO ocorrem em 1:1.000.000 de transfusões de concentrado de hemácias (BORDIN *et al.*, 2007; BRASIL, 2007; ROBACK *et al.*, 2008; BRASIL, 2009(b)).

2.4. Desenvolvimento dos anticorpos do Sistema ABO

O desenvolvimento dos anticorpos do Sistema ABO que podem ocasionar as Reações Transfusionais Imediatas ocorre basicamente de duas formas: natural ou imune, sendo que as imunoglobulinas desenvolvidas são principalmente das classes IgM e/ou IgG. O desenvolvimento imune ocorre quando o indivíduo entra em contato com antígenos eritrocitários ABO incompatíveis, seja por meio de transfusão, transplante ou gestação, quando ocorrerá o desenvolvimento de alo-anticorpos anti-A, anti-B e/ou anti-AB. Essa alo-imunização também pode ser desenvolvida através do contato com soros anti-diftéricos ou anti-tetânicos de origem animal ou bacteriana (FERNANDES *et al.*, 2008; ROBACK *et al.*, 2008; GIRELLO & KÜHN, 2011).

A imunização natural de anticorpos anti-A, anti-B e/ou Anti-AB se inicia cerca de três a seis meses de vida após o nascimento e a queda do título desses anticorpos ocorre após os 65 anos, podendo não ser mais detectado dependendo da técnica utilizada (ROBACK *et al.*, 2008; GIRELLO & KÜHN, 2011). Algumas bactérias da biota intestinal possuem antígenos semelhantes aos presentes nos eritrócitos e estimulam de forma passiva a formação desses anticorpos anti-ABO (SPRINGER & HORTON, 1969; ROBACK *et al.*, 2008; GIRELLO & KÜHN, 2011). Sabe-se que estruturas como poeira e pólen também são capazes de estimular a formação dessas imunoglobulinas (GIRELLO & KÜHN, 2011).

2.5. Hemolisina e anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em altos Títulos

Em 1923 o termo "O Perigoso" foi proposto por Levine & Mabee (1923), pois era comum ocorrer reações hemolíticas em pacientes que recebiam transfusões de sangue total de doadores do tipo O. Esses pacientes desenvolviam reações hemolíticas, pois no plasma da bolsa de sangue total havia uma grande quantidade de anticorpos anti-A; -B; -AB e por consequência os mesmos causavam a lise dos eritrócitos do paciente não tipo O (LEVINE & MABEE, 1923). Em 1946 Elbert & Emerson relataram que 1,1% dos doadores possuíam altos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO capazes de causar hemólise dos eritrócitos de pacientes (ELBERT & EMERSON, 1946).

O termo Hemolisina é aplicado quando um agente ou anticorpo possui a capacidade de hemolisar os eritrócitos utilizando as frações do complemento como precursor dessa hemólise. Essa atividade hemolítica é detectada através da titulação de anticorpos anti-ABO que se encontra

em níveis elevados ou através de técnicas de hemólise. No entanto, há divergência na literatura quanto ao valor limite do título para que o teste seja considerado como hemolisina negativo e também quanto à técnica que deve ser utilizada para essa detecção (FERNANDES *et al.*, 2008; NOVARETTI, 2008; ROBACK *et al.*, 2008).

São escassos os estudos da frequência de doadores de sangue classificados como O Perigoso, ou seja aqueles que possuem anticorpos contra antígenos do Sistema ABO hemolíticos capazes de hemolisar os eritrócitos dos pacientes que receberem hemocomponentes plasmáticos ou plaquetários contendo esses anticorpos (NOVARETTI, 2008). Um estudo realizado no Brasil com 4.447 doadores de sangue do Grupo O encontrou uma frequência de 3,8% de títulos de anticorpos do Sistema ABO acima de 1/100, sendo classificados como O perigoso (FERNANDES *et al.*, 2008). Outros estudos que também utilizaram como valor crítico 1/100 encontraram uma frequência de 12,8% (entre 600 doadores O), 13,4% (entre 10.435 doadores O) e 7,3% (entre 564 doadores O) (GAMBERO *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005; COSECHEN& MONTEIRO, 2008). Em outro estudo realizado em Porto Alegre, que também utilizou valor crítico 1/100 foi observado que entre 14.671 doadores classificados como O, 12,55% apresentavam hemolisina anti-A e 6% anti-B. Dentre 588 doações de plaquetas por aférese, os autores encontraram uma prevalência de 15,3% de hemolisinas anti-A, 2% anti-B e 2,4% anti-AB (OTTONI *et al.*, 2010). Sandes e colaboradores (2007), utilizando como valor crítico o título de 1/128, verificaram que 22,8% de doadores de plaquetas por aférese classificadas como tipo O possuíam altos títulos de anti-A e 17,9% possuíam títulos elevados de anti-B (SANDES *et al.*, 2007). Santos e colaboradores (2008), utilizando o mesmo valor crítico, observaram dentre 45 doadores de sangue classificados como O, que 35% possuíam altos títulos de anti-A, 10% de anti-B e 55% anti-A e Anti-B (SANTOS *et al.*, 2008).

2.6. Anticorpos do Sistema ABO e Bactérias

O estímulo do desenvolvimento e aumento de títulos de anticorpos do Sistema ABO através do contato com bactérias é há muito tempo estudado. Durante certo tempo haviam teorias de que os anticorpos do Sistema ABO eram herdados geneticamente através de pares de bases, assim como a herança genética dos antígenos eritrocitários. Springer e colaboradores (1959), na tentativa de desmitificar essa teoria em 1959, verificaram o desenvolvimento de anticorpos Anti-B em galinhas *White Leghorn* separando as aves em 3

grupos: (a) Aves criadas em ambiente comum onde tiveram seu nascimento, desenvolvimento e alimentação normais, (b) aves criadas em ambiente com alimentação balanceada e água esterilizada e (c) aves criadas no mesmo ambiente que o grupo anterior e que receberam a mesma água e alimentação contaminadas com *Escherichia coli*O⁸⁶:B7 até 12 dias antes do abatimento dos animais. Após análise da biotaintestinal da cloaca dos grupos verificou-se que o grupo (b) possuía *E. Coli*, no entanto não interferiram no bem estar das aves. Não foram encontradas *Escherichia coli*O⁸⁶:B7 no grupo (a), sendo que foram encontradas as respectivas bactérias na biota intestinal do grupo (c). As amostras de soro dos animais foram tituladas e as reações incubadas em lâminas entre 4-6 horas em temperatura ambiente. Os resultados mostraram que o grupo (a) desenvolveu anticorpos anti-B, no entanto com um título de 1/32 em até 45 dias de vida. No grupo (b) 2/5 das aves não possuíam anticorpos Anti-Be 3/5 das aves tinham títulos de até 1/4 até 94 dias de vida. No grupo (c) foram encontrados títulos até 10 vezes maiores do que o grupo (a) após 66 dias de vida. Assim, os autores comprovaram que o desenvolvimento de anticorpos anti-B do Sistema ABO ocorre de forma passiva através do sistema imune e não através de herança genética (SPRINGER *et al.*, 1959).

Ainda neste sentido, foi demonstrado o desenvolvimento e o aumento de títulos de anticorpos do Sistema ABO em 14 adultos e 9 crianças analisando-se o soro desses pacientes pré e pós-imunização após terem ingerido ou inalado *Escherichia coli* O⁸⁶ mortas (SPRINGER & HORTON, 1969).

Outro estudo avaliou o título de anticorpos do Sistema ABO antes e após a vacina pneumocócica em 40 pacientes e evidenciou um aumento no título de anticorpos anti-A. Embora no estudo não tenha sido avaliado a classe IgM destes anticorpos, o título de anti-A da classe IgG chegou a ser 2 vezes maior após 4 semanas da vacinação (BOYER *et al.*, 1981).

A relação entre bactérias e o Sistema ABO não se restringe somente a capacidade dessas em elevar os títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, mas também sua interação com os antígenos desse sistema. Alguns microrganismos utilizam os carboidratos de grupos sanguíneos presentes nas mucosas para se fixar nos tecidos (PERRY *et al.*, 2007; STOWELL *et al.*, 2010). Por exemplo, a *Helicobacter pylori* está adaptada a utilizar os antígenos ABO da mucosa gástrica como uma das moléculas de adesão, proporcionando a

esta bactéria a possibilidade de disseminação (UCHIDA *et al.*, 2006; STOWELL *et al.*, 2010).

Da mesma forma o gênero *Lactobacillus*, presente em probióticos, utilizam adesinas e colágeno da mucosa gástrica para se fixar no lúmen intestinal, e podem também utilizar os antígenos ABO como receptores e ligantes (UCHIDA *et al.*, 2006; PERRY *et al.*, 2007). Sabe-se também que os antígenos do Sistema ABO nos tecidos são mais complexos do que os presentes nos eritrócitos, visto que os da mucosa sofrem grande influência do Sistema Lewis (secretor) (PERRY *et al.*, 2007). Um estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou que estas bactérias possuem lectinas ABO que podem servir como moléculas de adesão durante a infecção e que esse é um passo crítico na patogênese de infecções em humanos (WU *et al.*, 2006).

Além dos antígenos ABO servirem como moléculas de adesão, os carboidratos desses antígenos podem auxiliar no desenvolvimento das bactérias. Estudos mostram que derivados da N-acetil-p-D-glucosamidas servem como fator de crescimento para as *Lactobacillus bifidus var. Pennsylvanicus*, sendo que isômeros da N-acetil-D-glucosamina foram biologicamente sintetizados a partir desta espécie devido a presença de beta-transgalactosidases (ROSE *et al.*, 1954; ZILLIKEN, 1955(a); ZILLIKEN, 1955(b)).

Quando presentes em vacinas, os antígenos ABO podem desencadear complicações transfusionais. Até 1981 vacinas pneumocócicas possuíam polissacarídeos em sua composição, sendo que um dos carboidratos era um antígeno A-like do Sistema ABO. Neste contexto, há relatos de reações transfusionais ocasionadas pela transfusão de sangue de doadores com antígeno A-like contido em vacinas administradas anteriormente aos doadores. Além disso, sabe-se que vacinas contra difteria, tétano, febre tifoide e vacinas contra o vírus influenza podiam elevar o título de anticorpos do Sistema ABO. Em 1988, um estudo foi realizado para avaliar os anticorpos da classe IgM, IgG e IgA anti-A, induzidos por vacina pneumocócica. No estudo, 10 mulheres e 10 homens saudáveis e com idade entre 20 e 46 anos receberam 0,5 mL vacina polissacarídica pneumocócica intramuscular. O soro foi obtido antes da vacinação, no dia, três semanas, 6 e 18 meses após a vacinação. O soro foi diluído 1/100 e os títulos de anticorpos anti-A das classes IgM, IgG e IgA foram avaliados através da técnica em microplaca. Níveis elevados de anticorpos anti-A três semanas após a vacinação foram encontrados em 10 de 11 indivíduos de indivíduos do Grupo O e B para anticorpos da classe IgA, 9 de 11 para IgG e IgM. Após 18 meses da vacinação foi observado

aumento dos títulos de Anti-A IgA em 9 de 11 indivíduos, IgG em 8 de 11 e IgM em 2 de 11. Estatisticamente todos os resultados pós-vacinação foram significativamente diferentes em relação ao período anterior à vacinação. Os autores concluíram na época que embora as vacinas pareçam ser seguras, os métodos de produção de vacinas deviam assegurar a ausência de substâncias de grupo sanguíneo no produto final para eliminar o risco de reações hemolíticas (KOSKELA *et al.*, 1988).

Um estudo que chama atenção quanto a relação entre bactérias e Sistema ABO é o que envolve a destruição dos eritrócitos por hemolisinas ABO, realizado por Daniel-Johnson e colaboradores (2009). Os autores relatam dois pacientes tipo B RhD Positivo que receberam uma unidade de plaquetas tipo A RhD Positivo coletada por aférese. Este hemocomponente possuía título elevado de anti-B e os pacientes desenvolveram reação transfusional hemolítica. A investigação do histórico do doador constatou que o mesmo havia realizado 134 doações de plaquetas por aférese e até o momento nenhuma reação hemolítica ocorrera em pacientes que receberam as unidades de plaquetas desse doador. Ao questionar mais detalhadamente o doador, o mesmo relatou que havia iniciado três semanas antes da doação tratamento com três cápsulas de probióticos/dia.

2.7. Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos presentes em alimentos que quando consumidos em quantidade adequada conferem benefícios à saúde de indivíduos. Há também disponível no mercado os prebióticos que são substâncias não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e atividade de bactérias intestinais trazendo benefício ao usuário. Já os simbióticos são produtos que contêm pré- e probióticos (STEFE *et al.*, 2008; OELSCHLAEGGER, 2010).

As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas como probióticos, mas *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* e *Bacillus* também estão presentes em produtos lácteos e outros alimentos (SAAD, 2006; OMG, 2008; STEFE *et al.*, 2008; OELSCHLAEGGER, 2010).

Esses produtos probióticos são comercializados em todos os continentes e vêm ganhando um considerável espaço na venda de produtos lácteos. Devido à grande oportunidade de comércio, entre 2001 e 2005 foi publicado quatro vezes mais ensaios clínicos em humanos com esses produtos do que no período de 1996 a 2000 (OMG, 2008).

2.8. Probióticos e o Sistema Imune

O cólon intestinal possui uma enorme diversidade microbiana sendo que muitas dessas bactérias são responsáveis por estimular de forma passiva a formação de anticorpos Anti-A, anti-B e/ou anti-AB (GIRELLO & KÜHN, 2011). Embora o mecanismo de ação dos probióticos no aumento da resposta imune não esteja completamente esclarecido se sabe que os mesmos ativam macrófagos locais presentes no intestino delgado para que esses apresentem os antígenos capturados no cólon intestinal aos linfócitos B e por consequência aumentam a produção de imunoglobulinas (COPOLLA & GIL-TURNES, 2004; SAAD, 2006; OMG, 2008).

O aumento da resposta imune após o uso de pré e probióticos vem sendo relatado em diversos estudos. Jahreis e colaboradores (2002) verificaram que probióticos são capazes de estimular a formação de anticorpos contra a LDL oxidada e aumentar os níveis de linfócitos T CD4+. Búrigo e colaboradores (2007) verificaram que prebióticos foram capazes de minimizar efeitos inflamatórios, observado pela redução de proteínas de fase aguda, em pacientes com neoplasias hematológicas.

Outros estudos observaram redução na duração de processos infecciosos respiratórios e aumento na concentração de anticorpos da classe IgA em indivíduos que utilizaram leite contendo microbióticos em relação à indivíduos que utilizaram placebo (TURCHET *et al.*, 2003; COBOSANZ *et al.*, 2006; BÚRIGO *et al.*, 2007).

Os iogurtes contendo microbióticos disponíveis no mercado são capazes de regular a função intestinal e estimular a resposta imune (COPOLLA & GIL-TURNES, 2004; SAAD, 2006). Esses produtos lácteos possuem microbióticos viáveis mesmo após permanecer refrigerado (BARRANTES *et al.*, 2004). A facilidade de aquisição desses produtos (iogurtes e leites fermentados) sem orientação de um especialista, causa certa preocupação. Os candidatos à doação de sangue não são questionados quanto ao uso de pré e probióticos durante a triagem clínica, sendo que não há obrigatoriedade em pesquisar anticorpos contra antígenos do Sistema ABO hemolíticos nos doadores de sangue (BRASIL, 2011 (a)).

Desta forma, as evidências do aumento da resposta imune de indivíduos que consomem probióticos, as reações hemolíticas causadas por elevados títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e a escassez de trabalhos relacionando o consumo destes produtos e o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO justificam a realização deste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais:

Realizar um estudo clínico em seres humanos para avaliar o efeito do consumo de probióticos sobre os títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO.

3.2. Objetivos Específicos:

Analisar a frequência do fenótipo ABO e a presença Anticorpos Irregulares entre todos os voluntários;

Determinar e comparar a prevalência do título de anticorpos anti-A e anti-B de voluntários antes da ingestão, após a restrição do uso de probióticos e depois do consumo de iogurte probiótico pelo período de 30 dias;

Determinar o percentual de amostras com títulos críticos antes e após o consumo de iogurte probiótico de acordo com os critérios do *National Health Service Blood and Transplant*;

Determinar a frequência de Hemolisinas ABO de voluntários antes da ingestão, após a restrição e depois do consumo de iogurte probiótico;

Analisar o comportamento de resultados de Pesquisa de Hemolisinas ABO de voluntários após a ingestão de produtos contendo probióticos;

Verificar se há correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal de voluntários antes da ingestão, após a restrição e depois do consumo de iogurte probiótico pelo período de 30 dias;

Avaliar se há relação entre a concentração de bifidobactérias fecais de título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO após o consumo de probióticos;

Verificar se há concordância entre os resultados de Pesquisa de Hemolisinas e títulos elevados de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO;

Analisar se há relação entre a idade e título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO antes da ingestão de probióticos, após período de restrição e depois do consumo de iogurte probiótico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

A determinação do número de voluntários foi realizada de acordo com Carvalho & Castro (2001), tendo como base a frequência média de Hemolisinas Positivas observada em doadores de sangue em pesquisas realizadas no Brasil (GAMBERO *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008).

Cálculo do tamanho amostral:

Quando N (tamanho da população) é desconhecido:

$$n = \frac{Z^2_{(\alpha/2)} \times p(1-p)}{d^2}$$

onde:

p = prevalência média de hemolisinas na população de acordo com a literatura = 9% (0,09)

IC = intervalo de confiança do estudo = 95%

d = precisão do valor real com confiança de 95% = 5% (0,05)

$\alpha = 100 - IC = 100 - 95 = 5\%$ (0,05)

$\alpha/2 = 0,05/2 = 0,025$

$z(\alpha/2) = z(0,025) = 1,96$

então $n = \frac{1,96^2 \times 0,09(1-0,09)}{(0,05)^2} = 125,85$ voluntários

Este projeto de pesquisa foi realizado de acordo com as diretrizes e normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, da declaração de Helsinki (2000) *World Health Association* e da Resolução 116/96 (ANVISA). Foram selecionados 126 voluntários saudáveis entre 18 e 65 anos de idade, recrutados aleatoriamente pelo pesquisador após apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1) e concordância com o protocolo experimental, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC sob parecer número 1768.

Os voluntários das cidades de Blumenau e Florianópolis (Santa Catarina) que aceitaram participar da pesquisa foram submetidos ao questionário (Apêndice2) que incluía requisitos não estabelecidos pela legislação em vigor e requisitos de exclusão para o estudo.

Para os voluntários aprovados no questionário (Apêndice2) foi entregue um guia contendo instruções e informações sobre a pesquisa (Apêndice3).

Dos voluntários incluídos no estudo deu-se início à Fase I, que consistia na coleta de duas amostras de sangue para determinação do título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO no soro, Pesquisa de Hemolisinas ABO, determinação do fenótipo ABO e realização da Pesquisa de Anticorpos Irregulares em sangue total. Em paralelo à coleta de amostras de sangue foi solicitada a coleta de uma amostra de fezes para quantificação das bifidobactérias e análise (medição) do pH fecal.

Após a coleta das amostras de sangue e fezes os voluntários foram instruídos a não utilizarem pré- e/ou probióticos durante os 40 dias seguintes, sendo iniciado assim o período de Quarentena (Fase II). A Fase II foi encerrada após o período de quarentena quando foram coletadas novas amostras de sangue e de fezes, com as quais foi determinado novamente o título de anticorpos e quantificação das bifidobactérias e análise do pH fecal, respectivamente.

Após a Fase II deu-se início à Fase III, na qual os voluntários passaram a consumir uma unidade (1) de iogurte probiótico (pote de 100 g de Piá Essence, PIÁ[®], Nova Petrópolis-RS) por dia durante um mês. Os iogurtes foram doados pela Cooperativa Agropecuária Petrópolis LTDA Indústria de Alimentos. Após esse período foi coletada novamente uma amostra de sangue e uma de fezes para analisar o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e a quantidade de bifidobactérias e pH fecal, respectivamente após o consumo de iogurte probiótico encerrando assim a Fase III.

As datas das coletas de amostras de sangue e fezes foram definidas individualmente com cada voluntário. As coletas de sangue foram realizadas pelo pesquisador nas residências dos voluntários. Para a Pesquisa de Hemolisinas, Fenotipagem ABO e Pesquisa de Anticorpos Irregulares foi coletada de cada indivíduo uma amostra de sangue em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro e uma amostra de sangue em tubo com EDTA para obtenção de plasma.

As coletas de fezes foram realizadas pelos voluntários em saco plástico com fecho hermético previamente fornecido pelo pesquisador.

4.2. Critérios de Exclusão

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão para a participação na pesquisa:

- Indivíduos com suspeita ou diagnóstico de doenças auto-imunes;
- Indivíduos com suspeita ou diagnóstico de Diabetes;
- Indivíduos com intolerância à lactose;
- Indivíduos com alergia a qualquer excipiente contido no iogurte;
- Indivíduos que consumiram produtos contendo prebióticos e/ou probióticos nos 3 meses antecedentes ao início da pesquisa;
- Indivíduos com fenótipo AB;
- Indivíduos que receberam vacina antitetânica ou antidiftérica nos 3 meses antecedentes ao início da pesquisa;
- Indivíduos que apresentaram Pesquisa de Anticorpos Irregulares Positiva;
- Indivíduos que apresentaram quadro de febre, diarreia e/ou vômitos nos 3 meses antecedentes ao início da pesquisa.
- Indivíduo que apresentassem quadro de febre, diarreia e/ou vômitos durante o estudo;

A titulação dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e a Pesquisa de Hemolisinas foram realizadas no Laboratório de Imuno-hematologia do Hemocentro Regional de Blumenau. A quantificação das bifidobactérias e análise do pH fecal foram realizadas no laboratório de Gestão da Qualidade no Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

4.3. Fenotipagem ABO e Pesquisa de Anticorpos Irregulares

A amostra de sangue colhida com EDTA foi utilizada para a realização da Fenotipagem ABO e Pesquisa de Anticorpos Irregulares conforme preconizado a legislação em vigor (BRASIL, 2011 (a)). O resultado da Fenotipagem ABO foi concluído mediante realização da Prova Direta e Reversa, utilizando soros monoclonais anti-A, anti-B, anti-AB da Bio-Rad Laboratories® e reagentes de hemácias a 3% do fabricante Bio-Rad Laboratories®. A técnica em tubo seguiu o padrão de leitura da intensidade da reação conforme Girello & Kuhn, 2011.

A Pesquisa de Anticorpos Irregulares foi realizada em tubo utilizando-se os reagentes de hemácias (DiaCell I+II®) e potencializadores de reações (DiaLiss) da fabricante Bio-rad Laboratories®. A Antiglobulina Humana monoespecífica IgG utilizada em tubo foi o Coombs-Serum IgG® da Bio-Rad Laboratories®. A Pesquisa de Anticorpos Irregulares em tubo foi executada aplicando-se 50 µL de reagente de hemácias em tubos de hemólise de vidro e adicionando-se 100 µL das amostras em cada tubo. Após

homogeneização foi realizada centrifugação por 15 segundos a 3400 rpm. A leitura da reação em Temperatura Ambiente (TA) foi realizada com auxílio de aglutinoscópio e posteriormente foi adicionado em cada tubo 100µL de DiaLiss®. A fase de antiglobulina humana indireta (AGH) foi realizada incubando-se os tubos com DiaLiss® durante 5 minutos a 37°C e posteriormente lavando-os 3 vezes com solução salina e em seguida adicionando-se 100 µL de AGH. A leitura da reação foi realizada após centrifugação por 15 segundos a 3400 rpm com auxílio de aglutinoscópio. A técnica em tubo seguiu o padrão de leitura da intensidade da reação conforme Girello & Kuhn, 2011, sendo que para as reações negativas na fase de AGH, as mesmas foram confirmadas com hemácias Controle de Coombs (Bio-Rad Laboratories®), conforme preconiza a legislação em vigor (BRASIL, 2011 (a)).

4.4. Pesquisa de Hemolisinas A e B

A Pesquisa de Hemolisinas A e B foi executada em até 1 hora após a coleta do sangue. Quando a Pesquisa de Hemolisina não pode ser executada dentro deste período, o soro foi separado e congelado a -20°C por no máximo 14 dias, visto que as proteínas do Sistema Complemento apresentam validade de até 2 meses nesta temperatura (MOLLISON *et al.*, 2005). Quando o soro foi descongelado a Pesquisa de Hemolisina foi executada imediatamente.

A técnica utilizada foi adaptada de Oliveira& Góes, (1999), 2 tubos foram identificados da seguinte maneira:

Tubo HA + nº sequencial da amostra testada para os Grupos O e B;

Tubo HB + nº sequencial da amostra testada para os Grupos O e A;

Em seguida 100 uL do soro da respectiva amostra foi dispensado em um tubo identificado como HA e 100 uL em um tubo HB. Posteriormente 50uL de suspensão de hemácias comerciais A₁ 3% (DiaCell ABO (A1+B)®) da fabricante Bio-rad Laboratories®, contendo os conservantes sulfametoxazol e trimetoprima, foram adicionados no tubo HA e 50uL de suspensão de hemácias B 3% (DiaCell ABO (A1+B)®) da fabricante Bio-rad Laboratories® no tubo HB.

As reações foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1 hora, sendo que a cada 20 minutos as mesmas foram homogeneizadas. Posteriormente as reações foram centrifugadas a 3.400 rpm por 15 segundos para observação da presença ou ausência de hemólise.

Foram considerados resultados de hemolisina positiva amostras que apresentaram hemólise total ou parcial (destruição de 50% do botão

de hemácias) através da observação visual das reações em tubo. Foram considerados resultados de hemolisina negativo ausência de hemólise ou reações com a presença de mais de 50% do botão de hemácias.

Durante a Pesquisa de Hemolisinas A e B para as amostras do Grupo O, nas quais foram pesquisadas duas especificidades de anticorpos (Hemolisina A e Hemolisina B), foram consideradas amostras Hemolisina Positiva quando pelo menos uma das hemolisinas foi Positiva. Foram consideradas amostras Hemolisina Negativa aquelas em que ambas as especificidades (Hemolisina A e B) foram negativas.

4.5. Determinação dos títulos de anticorpos anti-A e anti-B

A determinação do título de hemolisinas Anti-A e Anti-B foi realizada de acordo com Judd e colaboradores (2008) por meio da titulação seriada do soro dos indivíduos. Para a determinação da classe do anticorpo (IgM e IgG) foram realizadas 2 (duas) baterias de diluições seriadas até 1/512, uma para IgM outra para IgG. Quando necessário as titulações foram ampliadas.

As amostras coletadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos. As baterias de diluições do soro foram identificadas da seguinte forma:

Tubo HA + nº sequencial da amostra testada, título e classe a ser determinada;

Tubo HB + nº sequencial da amostra testada, título e classe a ser determinada;

Em seguida foi adicionado 50uL de suspensão de hemácias A₁ 3% (Revercell I e II[®]) da fabricante Bio-rad Laboratories[®], no tubo previamente identificado como HA e 50uL de suspensão de hemácias B 3% (Revercell I e II[®]) da fabricante Bio-rad Laboratories[®], no tubo previamente identificado como HB.

Fase em Temperatura Ambiente (TA)

Para a titulação de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO de classe IgM, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 3.400 rpm por 15 segundos. A leitura da reação em (TA) foi realizada verificando-se a presença ou ausência de hemólise e/ou aglutinação. Caso tenha sido verificada hemólise e/ou aglutinação no título 1/512, a diluição foi ampliada.

Foram consideradas reações positivas títulos maiores ou iguais a 1/128 durante a leitura das reações em TA de acordo a revisão realizada pelo *English National Health Service Blood and Transplant* (NHSBT) (WIN, 2012).

Fase de Antiglobulina Humana Indireta (AGH)

Para a titulação de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO de classe IgG os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C durante 60 minutos. Em seguida as hemácias foram lavadas por três vezes com solução fisiológica e adicionado 100 uL de Antiglobulina Humana monoespecífica IgG Coombs-Serum IgG® da Bio-Rad Laboratories®. Posteriormente as reações foram homogeneizadas e centrifugadas a 3.400 rpm por 15 segundos. A leitura da reação foi realizada verificando-se a presença ou ausência de hemólise e/ou aglutinação para caracterizar a reação de anticorpos de classe IgG. Caso tenha sido verificada hemólise e/ou aglutinação no título 1/512, a diluição foi ampliada.

Foram consideradas reações positivas títulos maiores ou iguais a 1/256 durante a leitura da reação em AGH de acordo a revisão realizada pelo NHSBT (WIN, 2012). No entanto, também foram avaliadas amostras consideradas críticas utilizando-se os títulos de 64 em TA e 128 em AGH.

Para avaliar o comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO da Fase II (quarentena) em relação à Fase I e da Fase III em relação à Fase I, foram consideradas amostras com título diminuído ou aumentado quando verificou-se que a variação foi de pelo menos dois títulos para menos ou para mais, respectivamente. Amostras que apresentaram variação de apenas um título ou não apresentaram alteração de título entre as fases foram consideradas amostras sem alteração de títulos.

Em amostras do Grupo O, que possuem anticorpos Anti-A e Anti-B, foram consideradas amostras que apresentaram aumento de título aquelas cujo pelo menos uma das especificidades de anticorpos (anti-A e/ou Anti-B) aumentou dois ou mais títulos. Foram consideradas amostras que tiveram queda de título, aquelas em que ambas especificidades (Anti-A e Anti-B) apresentaram diminuição de dois ou mais títulos. Amostras do Grupo O consideradas sem alteração dos títulos foram aquelas em que ambas especificidades de anticorpos (anti-A e Anti-B) alteraram até um título ou não apresentaram alteração de título.

Foram consideradas amostras do Grupo O com altos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO aquelas em que pelo menos um dos anticorpos pesquisados (anti-A e Anti-B) tenha ultrapassado o título crítico. Em casos de amostras do Grupo O, quando ambos os anticorpos não ultrapassaram o título crítico estabelecido, estas foram consideradas como não críticas.

Os títulos foram apresentados como título médio e desvio padrão da média. Quando relatada a prevalência dos títulos, os mesmos foram apresentados como Moda.

4.6. Determinação do conteúdo de bifidobactérias e pH fecal

Para o isolamento e quantificação de bifidobactérias e determinação do pH fecal, os participantes colheram amostras de fezes que foram encaminhadas ao laboratório e analisadas dentro de no máximo 8 horas após a coleta.

De cada voluntário, 1 g de fezes foi pesado e diluído em 9 mL de água destilada e deionizada estéril para verificação do pH em pHmetro PHTEK[®] previamente calibrado.

Também foi pesado 1 g de cada amostra de fezes e diluído em 9 mL de tampão fosfato. A mistura foi homogeneizada cinco vezes utilizando técnica anaeróbia. A partir desta diluição (10^{-1}) foram realizadas diluições decimais seriadas através da transferência de 100 μ L da diluição anterior para 900 μ L de tampão fosfato diluído até 10^{-7} . O tampão fosfato estoque foi previamente preparado com 34 g de KH_2PO_4 em 500 mL de água destilada, o pH ajustado para 7,2 com NaOH 1N, completado volume de água destilada suficiente para 1 L, esterilizado em autoclave a 121°C durante 18 minutos. Para a diluição da amostra foi utilizado tampão fosfato diluído mil vezes a partir da solução estoque.

O meio de cultura RCA (Reinforced Clostridial Agar, Difco[™] BD) suplementado com antibióticos (ácido nalidíxico 2%, sulfato de polimixina B 0.85%, sulfato de kanamicina 0.5%, ácido iodoacético 0.5%, cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio 0.5% e anfotericina B 0,001%) foi utilizado para o isolamento das bifidobactérias. De acordo com a padronização do ITAL (Instituto de Tecnologia em Alimentos-Campinas/SP) e segundo Munõa & Pares (1988) este é um meio específico e seletivo para tal isolamento.

A semeadura de 100 μ L de cada diluição foi realizada no meio RCA utilizando-se alça de Drigalski. As placas (identificadas com as respectivas diluições) foram incubadas a 37°C durante 72 horas em jarra de anaerobiose, utilizando sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbia (Anaerobac da Probac[®]).

Após 72 horas de incubação, foi realizada a contagem das colônias de bifidobactérias nas placas contendo entre 30 e 300 UFC, observando-se o crescimento de diferentes tipos de colônias. Para todos os tipos de colônias isoladas foram realizadas coloração de Gram, prova

da catalase e a reação da frutose-6-fosfato-fosfocetolase (F6PPK) para confirmação do gênero.

O método de detecção da F6PPK foi primeiramente descrito por Scardovi (1986), com modificações de Orban & Patterson (2000). Todas as colônias Gram positivas, em forma bacilar a cocoide e catalase negativas foram cultivadas em 10 ml de caldo clostridial reforçado (Himedia) em jaras de anaerobiose, a 37°C por 48 horas. Após esse período os caldos foram centrifugados a 10.000 g, a 4°C, por 15 minutos. Os *pellets* foram lavados duas vezes com a solução 1 (tampão fosfato KH_2PO_4 0,05 M contendo cisteína-HCl 500 mg/L e pH 6,5) e ressuspendidos em 1 mL da mesma solução. As células bacterianas foram rompidas pela adição de 0,4 mL de brometo de cetrímide (45 mg/mL) por um período de 5 minutos. Em seguida, 0,25 mL da solução 2 (NaF 3 mg/mL e iodoacetato de sódio 5mg/mL) e 0,25 mL da solução 3 (frutose-6-fosfato 80 mg/mL) foram adicionados, misturados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, para interromper a reação, 1,5 mL de solução 4 (hidroxilamina-HCl 13g/dL em água, pH 6.5) foi adicionado, misturado e deixado a temperatura ambiente por 10 minutos. Um mililitro de ácido tricloroacético a 15% (p/v) e 1 mL de HCl 4N foram adicionados para acidificar o meio. Um mililitro do indicador de cor cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 5% em HCl 0,1 M) foi adicionado e a solução agitada. O desenvolvimento de cor violeta indica a presença da enzima F6PPK e a coloração amarela indica resultado negativo (ORBAN & PATTERSON, 2000).

Os resultados da quantificação de bifidobactérias foram apresentados em unidades formadoras de colônia por grama de fezes (UFC/g). Para isto o número de UFC contados nas placas foi multiplicado pela respectiva diluição e corrigido pelo volume de amostra semeado.

4.7. Determinação do conteúdo de bifidobactérias e pH do iogurte

Para o isolamento e quantificação de bifidobactérias e determinação do pH no iogurte foram analisados todos os lotes dos iogurtes Piá Essence, PIÁ[®].

De cada lote, 1 pote contendo 100 g de iogurte foi selecionado aleatoriamente e 1g foi pesado e diluído em 9 mL de água destilada e deionizada estéril para verificação do pH em pHmetro PHTEK[®] previamente calibrado.

Também foi pesado 1 g e diluído em 9 mL de tampão fosfato e realizada diluição seriada como na análise das fezes. A semeadura da alíquota de cada diluição, contagem das colônias de bifidobactérias, a

confirmação do gênero e a expressão dos resultados foram realizados como na análise das fezes.

4.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 2007. Para análise de distribuição dos dados, foi aplicado o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson Omnibus Normality Test. O Coeficiente de Correlação de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre a concentração de bifidobactérias, pH fecal, título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e idade dos voluntários. A comparação dos resultados entre as fases foi realizada através da análise de Wilcoxon. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

A concordância entre o título de anticorpos do Sistema ABO e o resultado da Pesquisa de Hemolisina foi realizada por meio da análise do Coeficiente *Kappa* através do software Microsoft Excel[®]. Para análise da concordância foram utilizados os critérios de Landis & Koch (1977):

- $K=1$ Concordância perfeita
- $0,80 < K < 1$ Concordância excelente
- $0,60 < K < 0,80$ Concordância boa
- $0,40 < K < 0,60$ Concordância moderada
- $0 < K < 0,40$ Concordância fraca
- $K=0$ Ausência de concordância

5 RESULTADOS

Entre abril de 2011 e abril de 2012 foram recrutados 158 voluntários para este estudo, sendo obtidas 157 amostras de sangue e 139 amostras de fezes para a primeira fase da pesquisa. Dentre as 157 tipagens ABO, 70 (44,6%) foram classificadas como A, 14 (8,9%) como B, 67 (42,7%) como O e 6 (3,8%) como AB.

Dentre os 158 indivíduos recrutados 32 foram excluídos do estudo, sendo 1 voluntário por difícil acesso venoso, 18 por não terem coletado a primeira amostra de fezes, 7 por não terem coletado a última amostra de fezes e 6 por possuírem fenótipo AB. Nenhum indivíduo apresentou Anticorpos Irregulares. No total, 126 voluntários completaram as Fases I e III deste estudo. A análise estatística dos resultados dos primeiros 41 voluntários que estavam da Fase II, demonstrou que não havia diferença entre os resultados da Fase II em relação à Fase I. Neste contexto, não foi dada continuidade à Fase II para os demais voluntários que terminavam a fase I. Assim, quando os demais indivíduos encerravam a Fase I passavam diretamente para a Fase III (consumo de probióticos).

Os 126 voluntários apresentavam fenótipos ABO na seguinte proporção 45% (57) do grupo A, 9% (11) do grupo B e 46% (58) do grupo O. Entre os 126 voluntários 91 (72,0%) eram do sexo feminino e 35 (28,0%) masculino. A idade média dos 126 voluntários foi de 37 ± 11 anos (21 a 65 anos).

O intervalo médio entre a coleta de sangue e de fezes das amostras dos voluntários na Fase I foi de $3,8 \pm 6,3$ dias.

5.1. Fase I

5.1.1. Título de Anticorpos do Sistema ABO

As amostras com anticorpos anti-A em TA apresentaram títulos entre 1/8 e 1/512, sendo a média de $1/93 \pm 1/102$ e o título com maior prevalência foi de 1/32. O título para anti-B em TA variou entre 1/2 e 1/1024, com média de $1/105 \pm 1/178$ e o título com maior prevalência também foi de 1/32 (Figura 2).

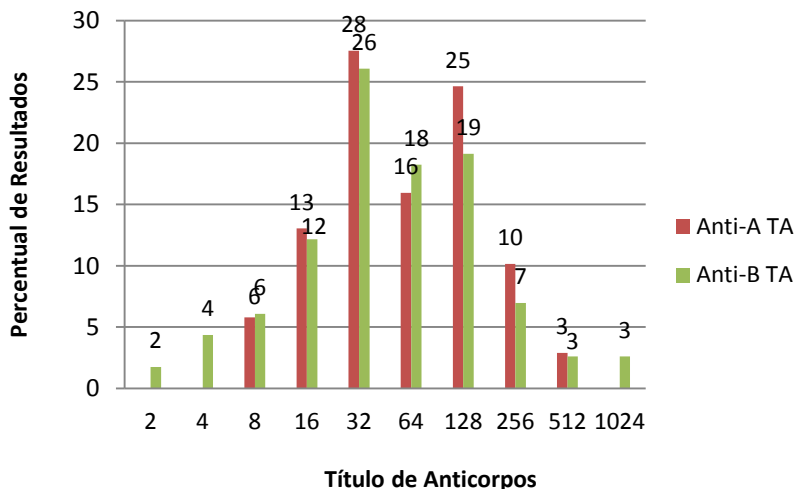


Figura 2 – Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação em Temperatura Ambiente das amostras na Fase I. O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. TA: Temperatura Ambiente.

O título das amostras com anticorpos anti-A em AGH variou entre 1/8e 1/16384 sendo a média de $1/613 \pm 1/1967$ e o título com maior prevalência foi de 1/128. Entre as variações para anti-B em AGH, os títulos estavam entre 1/4e 1/2048 sendo a média de $1/285 \pm 1/506$ e o título com maior prevalência também de 1/128 (Figura 3).

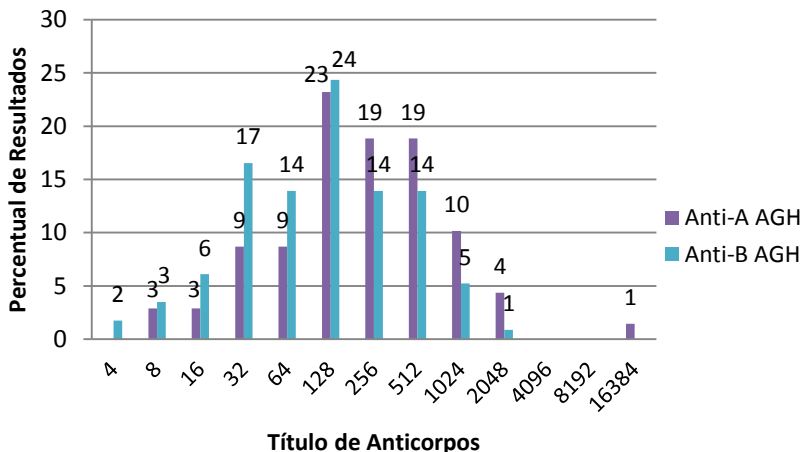


Figura 3 – Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana das amostras na Fase I. O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. AGH: Antiglobulina Humana.

A Tabela 3 demonstra que o maior percentual de amostras com títulos de anticorpos do Sistema ABO considerados críticos ($\geq 1/128$ em AGH) encontra-se no Grupo O (94,8%). Por outro lado o Grupo B apresentou o menor percentual de amostras com altos títulos ($\geq 1/256$ em AGH) de anticorpos do Sistema ABO. Considerando todas as 126 amostras (Grupo A, B e O), a utilização de títulos $\geq 1/128$ em TA e $\geq 1/256$ em AGH como críticos proporcionou menor percentagem de amostras com alto títulos de anticorpos do Sistema ABO.

Tabela 3. Percentual de amostras consideradas críticas de acordo com os diferentes títulos críticos na Fase I e Fenótipos ABO.

Grupo	% de amostras com título \geq 64 em TA (n)	% de amostras com título \geq 128 em TA (n)	% de amostras com título \geq 128 em AGH (n)	% de amostras com título \geq 256 em AGH (n)
Grupo A	49,1% (28)	28,1% (16)	40,1% (23)	12,3% (7)
Grupo B	27,3% (3)	27,3% (3)	18,2% (2)	9,1% (1)
Grupo O	72,4% (42)	56,9% (33)	94,8% (55)	74,1% (43)
Grupos A, B e O	57,9% (73)	32,5% (52)	63,5% (80)	40,5% (51)

Legenda: TA = Temperatura Ambiente; AGH = Antiglobulina Humana; % = Percentual de Amostras; (n) = Número absoluto de Amostra.

As figuras 4 e 5 apresentam a distribuição dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B encontrados nas reações em TA e AGH de acordo com a idade média dos voluntários. Não houve relação significativa entre a idade dos voluntários e o título de anticorpos Anti-A ($p=0,7654$) em TA e em AGH ($p=0,6772$). No entanto, houve relação significativa com Anti-B ($p=0,0104$) em TA com tendência linear de diminuição do título a medida que a idade média aumenta. Não observamos relação significativa entre títulos de Anti-B em AGH ($p=0,1654$) e a idade média dos voluntários, embora também haja uma tendência linear na queda do título de anticorpos anti-B em AGH.

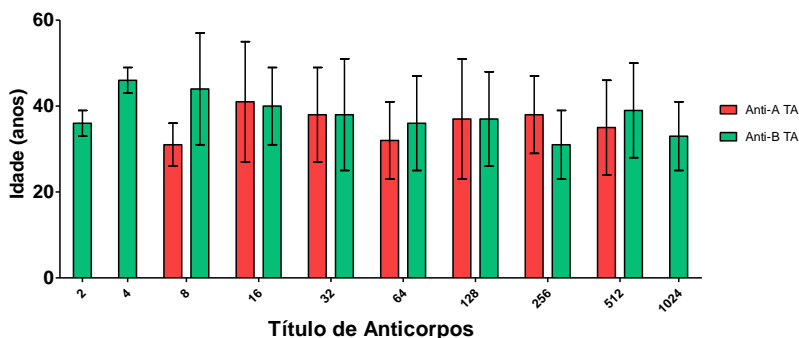


Figura 4 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação em Temperatura Ambiente na Fase I de acordo com a idade. TA = Temperatura Ambiente; O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. A idade é expressa em média \pm desvio padrão da média.

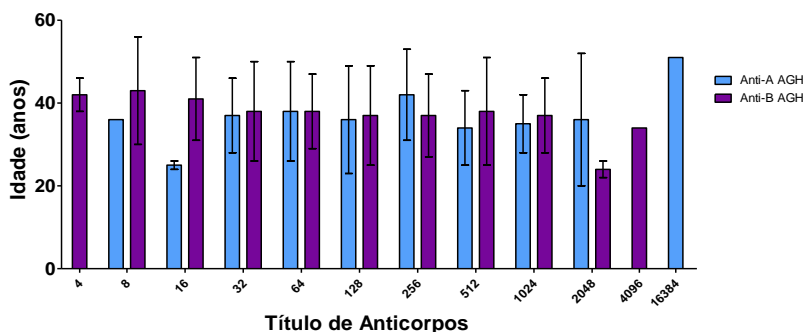


Figura 5 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana na Fase I de acordo com a idade. AGH = Antiglobulina Humana; O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. A idade é expressa em média \pm desvio padrão da média.

5.1.2. Pesquisa de Hemolisinas ABO

Entre as 69 amostras (Grupos B e O) que foram submetidas à Pesquisa de Hemolisina A, 41 (59,4%) apresentaram resultado positivo para o teste. Já entre as 115 amostras (Grupos A e O) em que foram realizadas a Pesquisa de Hemolisina B, 47 (40,9%) apresentaram resultado positivo para o teste (Figura 6). Entre os voluntários foi observada uma frequência de 49,2% de Hemolisinas Positivas (A e/ou B). Isoladamente a frequência entre os Grupos A, B e O foi de 21,1%, 45,5% e 78,9%, respectivamente. Entre as Hemolisinas Positivas do Grupo O, 62,2% das amostras apresentavam Hemolisinas A e B

Positivas, 20,0% somente Hemolisinas A e 17,8% somente Hemolisinas B.

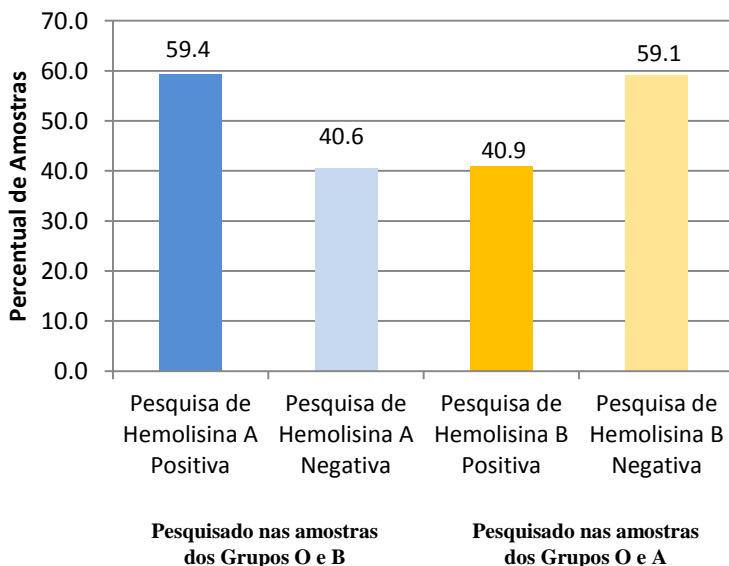


Figura 6 – Distribuição do percentual de resultados da Pesquisa de Hemolisina A e B na Fase I.

5.1.3. Comparação entre o título de anticorpos do Sistema ABO e o resultado de hemolisina

Utilizando-se a análise do Coeficiente *Kappa* (K) foi evidenciada pobre concordância entre o título de anticorpos Anti-A e Anti-B considerados críticos ($\geq 1/128$) na fase de TA e resultado de Hemolisina nas amostras ($K=0,0569$ e $K=0,2465$, respectivamente). O mesmo foi observado em relação aos anticorpos Anti-A considerados críticos ($\geq 1/256$) na fase de AGH ($K=0,2830$). No entanto, foi observada uma concordância moderada com anticorpos anti-B considerados críticos (≥ 256) na fase de AGH ($K=0,5032$).

Tabela 4. Concordância entre os resultados da Pesquisa de Hemolisina e Títulos de anticorpos do Sistema ABO.

Título	Hemolisina A Positiva	Hemolisina A Negativa	Hemolisina B Positiva	Hemolisina B Negativa
≥ 64 TA	23	17	29	29
< 64 TA	13	16	19	38
≥ 128 TA	19	8	19	17
< 128 TA	23	19	29	50
≥ 128 AGH	34	18	29	11
< 128 AGH	7	19	19	56
≥ 256 AGH	27	9	29	11
< 256 AGH	16	17	19	56

Da mesma forma, considerando-se os títulos críticos de 1/64 em TA e 1/128 em AGH, foi evidenciada pobre concordância entre o título de anticorpos Anti-A e Anti-B críticos em TA e resultado de Hemolisina A e B ($K=0,1364$ e $K=0,1640$, respectivamente). O mesmo foi observado em relação aos anticorpos Anti-A em AGH e resultados de Hemolisina A ($K=0,3386$). No entanto, com os anticorpos Anti-B considerados críticos ($\geq 1/128$) na fase de AGH, foi observada concordância moderada com os resultados de Hemolisina B ($K=0,5032$).

5.1.4. Bifidobactérias e pH fecal

Na fase I a quantificação de bifidobactérias nas fezes evidenciou uma média de $1,01 \times 10^9 \pm 5,79 \times 10^9$ UFC/g de fezes, e o pH fecal médio foi de $7,06 \pm 0,59$.

Não foi observada correlação entre a quantidade de bifidobactérias e o título de anticorpos Anti-A nas fases de TA ($p=0,2183$) e AGH ($p=0,6087$) e Anti-B nas fases de TA ($p=0,9453$) e AGH ($p=0,4597$).

Também não foi observada correlação significativa entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase I ($p=0,4306$) (Figura7).

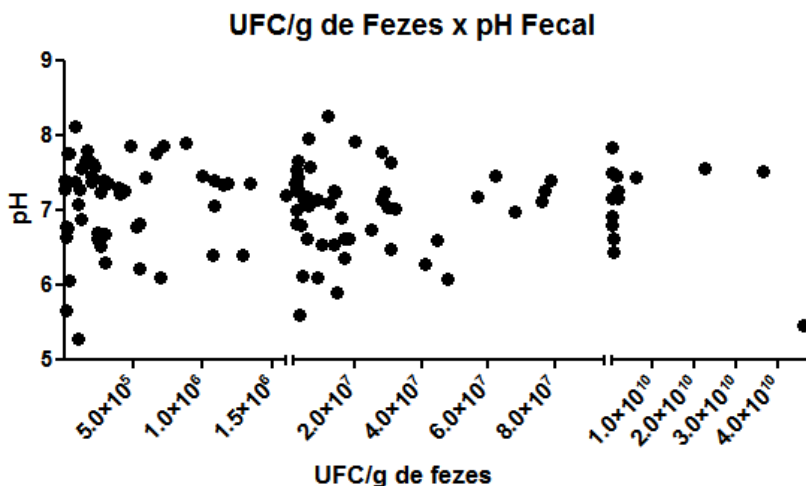


Figura 7 – Correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase I.

Em todas as amostras de fezes analisadas foram evidenciados bacilos Gram Positivos, com prova da catalase apresentando resultado negativo. Em todas as amostras foi evidenciada a presença da F6PPK.

5.2. Fase II

Os 41 voluntários participantes da Fase II apresentavam fenótipos ABO na seguinte proporção 54% (22) do grupo A, 5% (2) do grupo B e 41% (17) do grupo O. Entre os 41 voluntários 31 (76%) eram do sexo feminino e 10 (24%) masculino. A idade média dos 41 voluntários que participaram da fase II foi de 38 ± 12 anos, sendo que o voluntário mais jovem possuía 21 anos e o mais velho 64 anos.

A segunda fase (quarentena) durou em média 55 ± 27 dias. O intervalo médio entre a coleta de sangue e de fezes das amostras dos voluntários na Fase II foi de $4,2 \pm 4,8$ dias.

5.2.1. Título de Anticorpos do Sistema ABO

As amostras com anticorpos anti-A em TA apresentaram títulos entre 1/16 e 1/256, sendo que a média dos títulos foi de $1/108 \pm 1/87$ e o título com maior prevalência foi de 1/64. Os títulos para anti-B em TA

variaram entre $1/8$ e $1/256$, com média de $1/72 \pm 1/61$ e o título com maior prevalência também foi de $1/32$ (Figura 8).

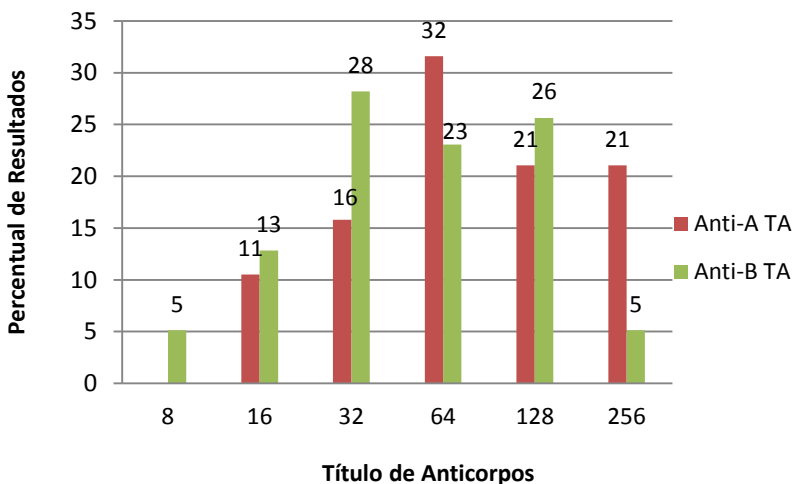


Figura 8 – Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação em Temperatura Ambiente das amostras na Fase II. O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. TA: Temperatura Ambiente.

O título com anticorpos anti-A em AGH variou entre $1/32$ e $1/4096$ sendo a média de $1/596 \pm 1/911$ e o título com maior prevalência foi de $1/512$. Entre as amostras com anti-B em AGH o título variou entre $1/16$ e $1/1024$ sendo a média de $1/183 \pm 1/194$ e o título com maior prevalência foi de $1/256$ (Figura 9).

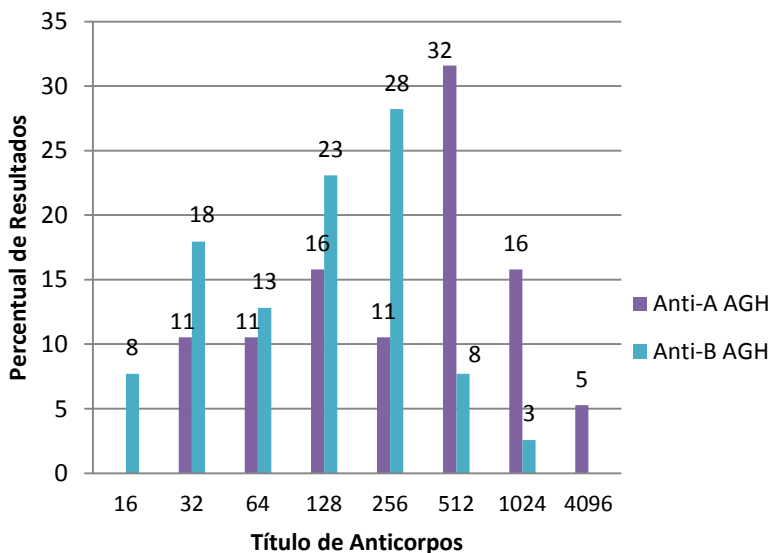


Figura 9 – Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana das amostras na Fase II. O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. AGH: Antiglobulina Humana.

A distribuição dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B na fase II encontrados nas reações em TA e AGH de acordo com a idade dos voluntários estão apresentados nas Figuras 10 e 11. Não houve relação significativa entre a idade dos voluntários e o título de anticorpos Anti-A ($p=0,8585$) e Anti-B ($p=0,3667$) em TA e nem em AGH ($p=0,5241$ e $p=0,8255$, respectivamente). No entanto, em TA houve tendência de diminuição do título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO à medida que a idade dos indivíduos foi aumentando.

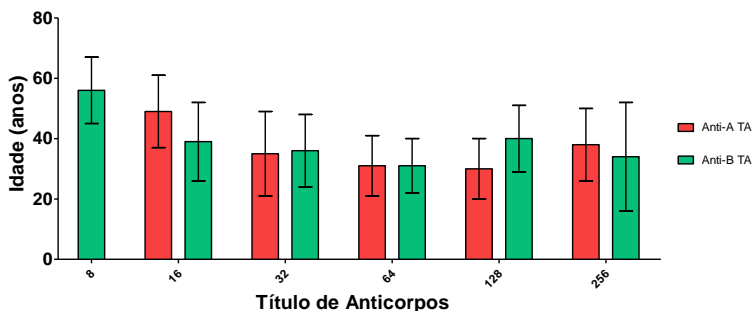


Figura 10 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação em Temperatura Ambiente na Fase II de acordo com a idade. TA = Temperatura Ambiente; O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. A idade é expressa em média \pm desvio padrão da média.

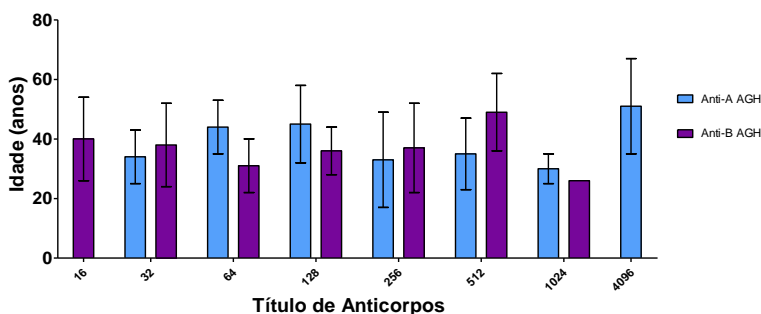


Figura 11 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana na Fase II de acordo com a idade. AGH = Antiglobulina Humana; DP = Desvio Padrão da média; O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. A idade é expressa em média \pm desvio padrão da média.

5.2.2. Pesquisa de Hemolisinas ABO

Entre as 19 amostras (Grupos B e O) em que foram realizadas a Pesquisa de Hemolisina A, 8 (42,1%) apresentaram resultado positivo para o teste. Entre as 39 amostras (Grupos A e O) em que foram realizadas a Pesquisa de Hemolisina B, 16 (41,0%) apresentaram resultado positivo para o teste (Figura 12). Entre os voluntários foi observada uma frequência de 41,5% de Hemolisinas Positivas (A e/ou B). Isoladamente a frequência entre os Grupos A, B e O foi de 31,8%, 50,0% e 52,9%, respectivamente. Entre as Hemolisinas Positivas do Grupo O, 55,6% das amostras apresentavam Hemolisinas A e B

Positivas, 11,1% somente Hemolisinas A e 33,3% somente Hemolisinas B.

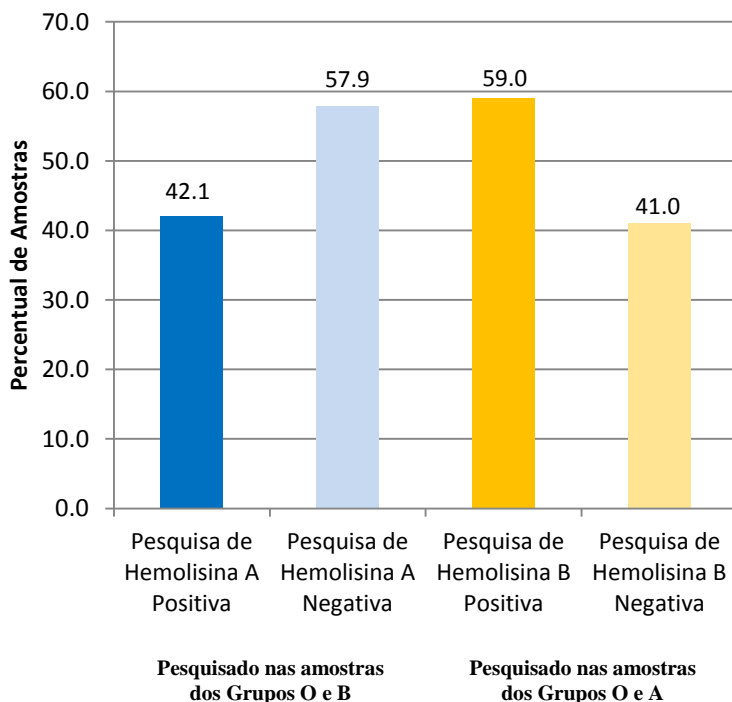


Figura 12 – Distribuição percentual de resultados com Pesquisa de Hemolisina A e B na Fase II.

5.2.3. Bifidobactérias e pH fecal

Na fase II foi quantificado em média $2,99 \times 10^8 \pm 11,9 \times 10^8$ UFC de bifidobactérias por grama de fezes e o pH fecal médio foi de $7,19 \pm 0,61$. Não foi observada relação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o título de anticorpos Anti-A nas fases de TA ($p=0,9387$) e AGH ($p=0,3077$) e Anti-B nas fases de TA ($p=0,9940$) e AGH ($p=0,7459$).

Também não foi observada correlação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o pH fecal da Fase II ($p=0,8921$) (Figura 13).

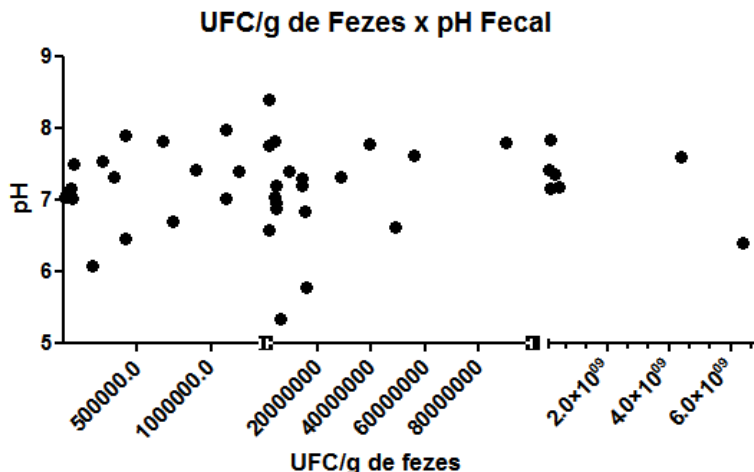


Figura 13 – Correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase II.

Em todas as amostras de fezes analisadas foram evidenciados bacilos Gram Positivos, com prova da catalase apresentando resultado negativo. Em todas as amostras foi evidenciada a presença da F6PPK.

5.2.4. Comparação dos resultados da Fase II em relação à Fase I

A Tabela 5 apresenta o comportamento dos resultados dos títulos dos anticorpos do Sistema ABO na Fase II em relação a Fase I. Entre as 19 amostras dos Grupos B e O da Fase II, em média 15% dos resultados de anti-A em TA e AGH apresentaram aumento de dois ou mais títulos e aproximadamente 75% dos resultados não apresentaram alteração dos títulos na Fase II em relação a Fase I. Para o título de anticorpos anti-A não houve diferença significativa em TA ($p=0,9749$) e em AGH ($p=0,5293$) entre essas fases, sendo que também não houve diferença significativa com os resultados de anticorpos anti-B em TA ($p=1,0000$) e em AGH ($p=0,4842$) da Fase II em relação a Fase I.

Tabela 5. Comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO na Fase II (quarentena) em relação à Fase I.

Anticorpo	Fase	% de resultados com aumento ≥ a 2 títulos (n)	% de resultados com diminuição ≥ a 2 títulos (n)	% de resultados sem alteração de títulos (n)
Anti-A	TA	16% (3)	16% (3)	68% (13)
	AGH	15% (3)	5% (1)	80% (15)
Anti-B	TA	15% (6)	13% (5)	72% (28)
	AGH	15% (6)	5% (2)	80% (31)

Legenda: TA = Temperatura Ambiente; AGH = Antiglobulina Humana; Aumento = Resultados que aumentaram 2 ou mais títulos; Diminuição = Resultados que diminuíram 2 ou mais títulos; Sem Alteração = Resultados que aumentaram ou diminuíram 1 título ou não houve mudança de título; % = Percentual de Resultados; (n) = Número absoluto de Resultados.

Analisando o comportamento das amostras foi possível observar que 66% e 71% das amostras em TA e AGH, respectivamente, não apresentaram a alteração dos títulos (Figura 14).

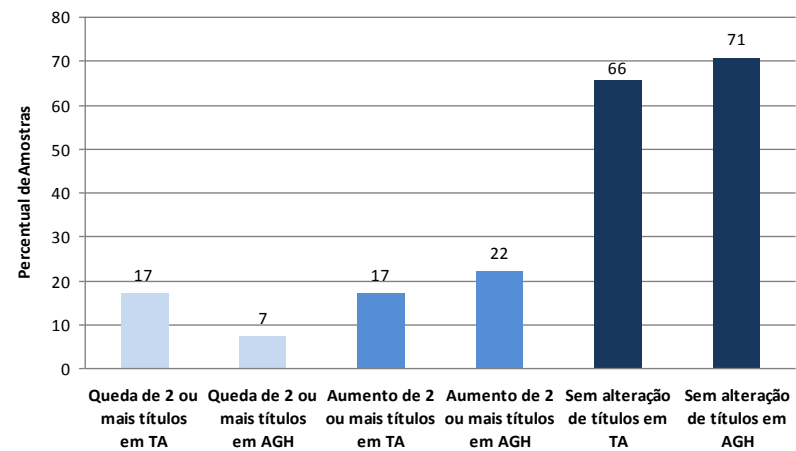


Figura 14 – Distribuição das amostras quanto ao comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO analisados na Fase II (quarentena) em relação à Fase I.

5.2.5. Pesquisa de Hemolisinas ABO

Analisando os resultados de todos os 41 indivíduos da Fase II em relação a Fase I, evidenciamos que 73,2% deles apresentaram alteração nos resultados de hemolisina, 19,5% passaram a ser considerados Hemolisina Positiva e 7,3% passaram ser considerados Hemolisina Negativa. Na Pesquisa de Hemolisina A (realizada nos indivíduos dos Grupos B e O) e na Pesquisa de Hemolisina B, (realizada nos indivíduos dos Grupos A e O) 13 (67%) e 29 (74%) resultados não sofreram alteração, 5 (28%) e 3 (9%) deixaram de ser positivas, e 1 (6%) e 7 (18%) passaram a ser positivas, respectivamente (Figura 15).

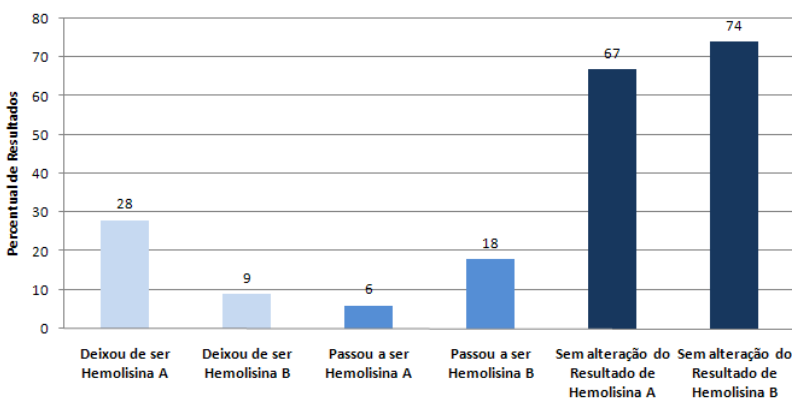


Figura 15 - Comportamento dos resultados da Pesquisa de Hemolisina na Fase II (quarentena) em relação à Fase I.

A Tabela 6 apresenta os resultados com alteração de título na fase II em relação à fase I e a intensidade da alteração. Os anticorpos anti-B foram os que mais apresentaram variação nos títulos.

Tabela 6. Intensidade de variação dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados em TA e AGH na Fase II em relação à Fase I.

Título	< 4	< 3	< 2	< 1	0	> 1	> 2	> 3	> 4
Anti-A Temperatura Ambiente									
n	1	-	3	4	5	3	1	2	-
Anti-B Temperatura Ambiente									
n	1	-	4	8	14	6	5	1	-
Anti-A Antiglobulina Humana									
n	-	-	2	4	7	2	3	1	-
Anti-B Antiglobulina Humana									
n	1	-	1	13	13	5	5	1	-

Legenda: TA = Temperatura Ambiente; AGH = Antiglobulina Humana; n = número de resultados; <4 a < 1 = Diminuição do respectivo número de título(s); 0 = Sem alteração do título; >1 a > 4 = Aumento do respectivo número de título(s); - = sem resultado.

5.2.6. Bifidobactérias e pH fecal da Fase II em relação a Fase I

Não houve diferença significativa ($p=0,7718$) entre a concentração de bifidobactérias nas fezes na Fase II em relação à Fase I. Também não foi observada diferença ($p=0,8334$) entre o pH fecal da Fase II e da Fase I.

5.3. Fase III

A frequência dos fenótipos do Sistema ABO, distribuição dos participantes por gênero e idade na Fase III foram os mesmos da Fase I.

O intervalo médio entre a coleta de sangue e de fezes das amostras dos voluntários na Fase III foi de $2,1 \pm 4,3$ dias. Os 126 voluntários ingeriram diariamente uma (1) unidade de iogurte probiótico contendo *Bifidobacterium* sp durante o período médio de $32 \pm 6,3$ dias.

5.3.1. Análise do Iogurte

A embalagem do produto informa que a cada 100 g de iogurte há 10^8 UFC de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*.

No total foram disponibilizados 34 lotes de iogurtes aos voluntários, sendo que a concentração média de bifidobactérias foi de $6,67 \times 10^8 \pm 10,3 \times 10^8$ UFC/g de iogurte. O pH médio do iogurte foi de $4,28 \pm 0,15$ e houve correlação significativa ($p = 0,0121$) entre a quantidade de bifidobactérias e o pH do iogurte.

Em todos os lotes de iogurtes houve crescimento de colônias de bacilos Gram Positivos com resultados da prova da catalase negativos e presença da F6PPK.

5.3.2. Título de Anticorpos do Sistema ABO

As amostras com anticorpos anti-A em TA apresentaram títulos entre 1/8e 1/512 sendo que a média dos títulos foi de $1/100 \pm 1/118$ e o título com maior prevalência foi de 1/64. Entre com anti-B em TA os títulos variaram entre 1/4e 1/512 com uma média de $1/76 \pm 1/96$ e o título com maior prevalência também foi de 1/16 (Figura 16).

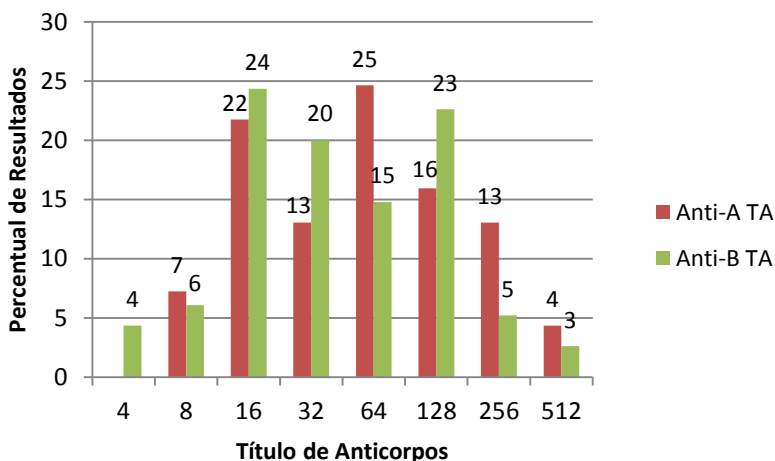


Figura 16 – Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação em Temperatura Ambiente das amostras na Fase III. O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. TA: Temperatura Ambiente.

O título das com anti-A em AGH variou entre 1/8e 1/16384, sendo a média de $1/803 \pm 1/2063$ e o título com maior prevalência foi de 1/256. Entre as amostras com anticorpos anti-B em AGH o título variou entre 1/2e 1/4096, sendo a média de $1/342 \pm 1/607$ e o título com maior prevalência também foi de 1/256 (Figura 17).

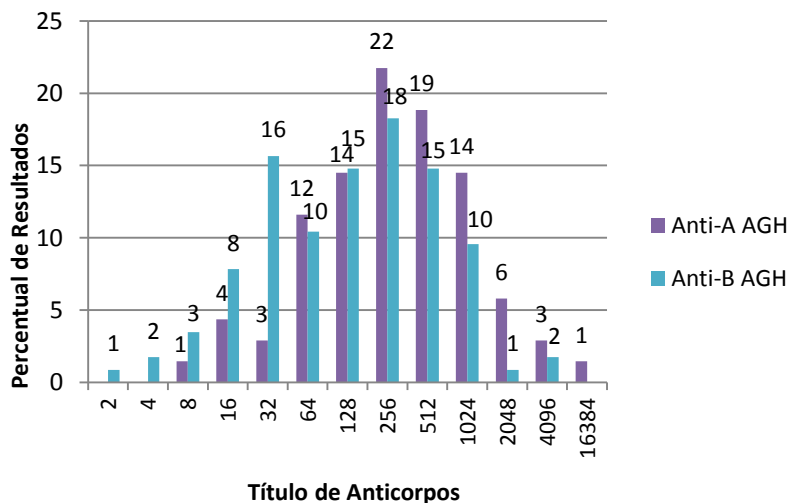


Figura 17– Distribuição percentual dos resultados de títulos de anticorpos do Sistema ABO com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana das amostras na Fase III. O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. AGH: Antiglobulina Humana.

A Tabela 7 demonstra que as amostras do Grupo O foram as que apresentaram mais títulos críticos de anticorpos, alcançando 94,8% das amostras quando considerado crítico títulos $\geq 1/128$ com leitura da reação em AGH. Por outro lado, o Grupo B apresentou o menor percentual de amostras com títulos críticos de anticorpos do Sistema ABO quando considerado críticos os títulos $\geq 1/64$ e $1/128$ na reação em TA. Considerando as 126 amostras (Grupos A, B e O) a combinação de títulos críticos $\geq 1/128$ em TA e $1/256$ em AGH proporcionou menor percentagem de amostras com altos títulos de anticorpos do Sistema ABO.

Tabela 7. Percentual de amostras consideradas críticas de acordo com os diferentes títulos críticos na Fase III.

Grupo	% de amostras com título \geq 64 em TA (n)	% de amostras com título \geq 128 em TA (n)	% de amostras com título \geq 128 em AGH (n)	% de amostras com título \geq 256 em AGH (n)
Grupo A	31,6% (18)	17,5% (10)	46,8% (21)	19,3% (11)
Grupo B	9,1% (1)	9,1% (1)	27,3% (3)	27,3% (3)
Grupo O	77,6% (45)	56,9% (33)	94,8% (55)	78,2% (50)
Grupo A, B e O	50,8% (64)	34,9% (44)	62,3% (79)	50,8% (64)

Legenda: TA = Temperatura Ambiente; AGH = Antiglobulina Humana; % = Percentual de Amostras; (n) = Número absoluto de Amostras.

A distribuição dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B encontrados nas reações em TA e AGH de acordo com a idade dos voluntários estão apresentados nas Figuras 18 e 19. Não houve relação significativa entre a idade dos voluntários e o título de anticorpos Anti-A ($p=0,5743$) em TA e em AGH ($p=0,1602$). No entanto, houve relação com anticorpos Anti-B ($p<0,0004$) em TA, mas não em AGH ($p=0,2839$). Pode-se observar, em geral, que os títulos de anticorpos anti-A e anti-B na leitura das reações com AGH em indivíduos com mais de 40 anos foram acima de $1/512$ e com idade maior que 40 anos superiores a $1/4096$. No entanto, alguns indivíduos com mais de 40 anos também apresentaram títulos baixos ($1/4$ e $1/8$) em AGH.

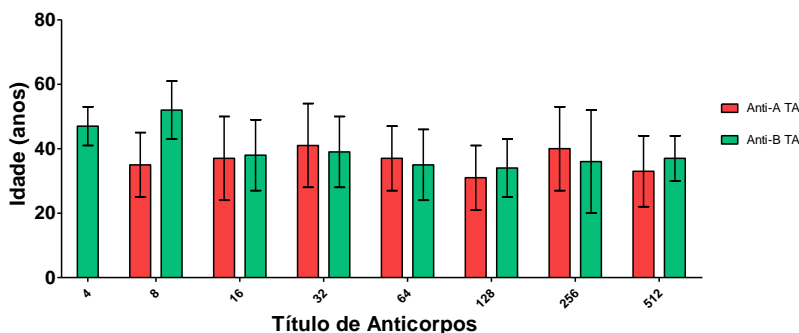


Figura 18 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação em Temperatura Ambiente na Fase III de acordo com a idade. TA = Temperatura Ambiente; O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. A idade é expressa em média \pm desvio padrão da média.

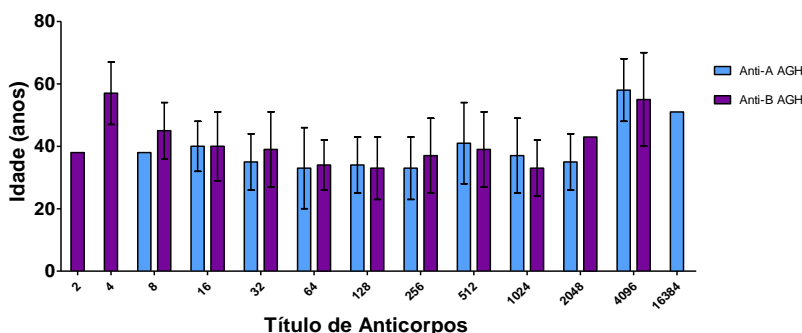


Figura 19 – Títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados com leitura da reação na fase de Antiglobulina Humana na Fase III de acordo com a idade. AGH = Antiglobulina Humana; O título de anticorpos é expresso apenas com o denominador. A idade é expressa em média \pm desvio padrão da média.

5.3.3. Pesquisa de Hemolisinas ABO

Entre as 69 amostras (Grupos B e O) em que foram realizadas a Pesquisa de Hemolisina A, 45 (65,2%) apresentaram resultado positivo para o teste. Entre as 115 amostras (Grupos A e O) em que foram realizadas a Pesquisa de Hemolisina B, 64 (55,7%) apresentaram resultado positivo para o teste (Figura 20). Entre os voluntários foi observada uma frequência de 41,7% de Hemolisinas Positivas (A e/ou

B). Isoladamente a frequência entre os Grupos A, B e O foi de 42,1%, 18,2% e 84,2%, respectivamente. Entre as Hemolisinas Positivas do Grupo O, 77,1% das amostras apresentavam Hemolisinas A e B Positivas, 14,6% somente Hemolisinas A e 8,3% somente Hemolisinas B.

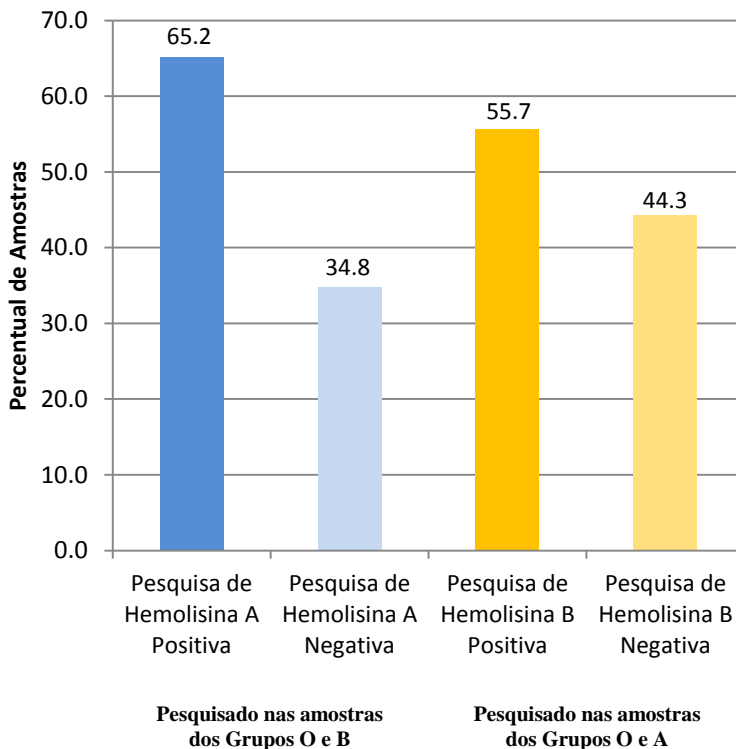


Figura 20 – Distribuição percentual de resultados com Pesquisa de Hemolisina A e B na Fase III.

5.3.4. Bifidobactérias e pH fecal

Na fase III foi quantificado em média $8,70 \times 10^8 \pm 40,8 \times 10^8$ UFC de bifidobactérias por grama de fezes e o pH fecal médio foi de $7,07 \pm 0,57$. Não foi observada correlação entre a quantidade de bifidobactérias e o título de anticorpos Anti-A nas fases de TA ($p=0,7753$) e AGH ($p=0,6293$) e Anti-B nas fases de TA ($p=0,9404$), mas sim nas leituras com AGH ($p=0,0462$).

Também não foi observada correlação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o pH fecal na Fase III ($p=0,6914$) (Figura 21).

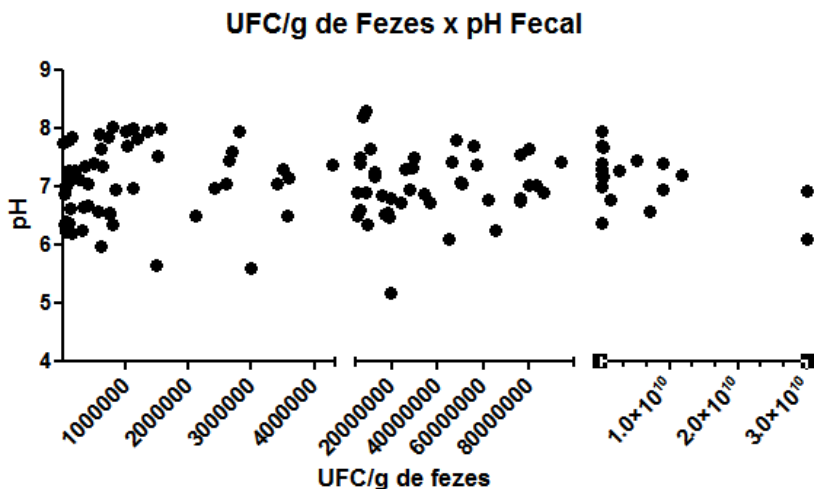


Figura 21 – Correlação entre a concentração de bifidobactérias e o pH fecal na Fase III.

Em todas as amostras de fezes analisadas foram evidenciados bacilos Gram Positivos com prova da catalase apresentando resultado negativo. Em todas as amostras foi evidenciada a presença da F6PPK.

5.3.5. Comparação dos resultados da Fase III em relação à Fase I

A Tabela 8 apresenta o comportamento dos resultados dos títulos de anticorpos do Sistema ABO na Fase III em relação a Fase I. Entre as 115 amostras dos Grupos A e O da Fase III, em média 15% dos resultados de anti-B em TA e AGH apresentaram aumento de dois ou mais títulos e aproximadamente 71% dos resultados não apresentaram alteração dos títulos na Fase III em relação Fase I. Houve diferença significativa ($p=0,0437$) entre o título de anticorpos Anti-B em TA após o consumo do probiótico, mas não em AGH ($p=0,2047$).

Em relação aos anticorpos anti-A, em média 72,5% dos resultados em TA e AGH não apresentaram alteração dos títulos, não havendo diferença significativa entre o título de anticorpos Anti-A em TA ($p=0,6614$), mas sim em AGH ($p=0,0253$) após o consumo do probiótico (Tabela 8).

Tabela 8. Comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO na Fase III em relação à Fase I.

Anticorpo	Fase	% de resultados com aumento \geq a 2 títulos (n)	% de resultados com diminuição \geq a 2 títulos (n)	% de resultados sem alteração de títulos (n)
Anti-A	TA	9% (6)	12% (8)	80% (55)
	AGH	26% (18)	9% (6)	65% (45)
Anti-B	TA	13% (15)	17% (19)	70% (81)
	AGH	17% (19)	11% (13)	72% (83)

Legenda: TA = Temperatura Ambiente; AGH = Antiglobulina Humana; Aumento = Resultados que aumentaram 2 ou mais títulos; Diminuição = Resultados que diminuíram 2 ou mais títulos; Sem Alteração = Resultados que aumentaram ou diminuíram 1 título ou não houve mudança de título; % = Percentual de Resultados; (n) = Número absoluto de Resultados.

Observando as fases em que as reações foram realizadas (TA e AGH) pode ser verificado maior aumento de títulos nas reações em AGH (26% e 17% para anti-A e anti-B, respectivamente) do que nas reações em TA (9% e 13% para anti-A e anti-B, respectivamente) (Tabela 8).

Analisando o comportamento das amostras foi possível observar que 81 (64%) amostras em TA não apresentaram alteração dos títulos na Fase III em relação à Fase I. Entre as amostras que apresentaram aumento no título de anticorpos do Sistema ABO as reações na fase de AGH foram as que mais aumentaram, somando 32 (25%) amostras (Figura 22).

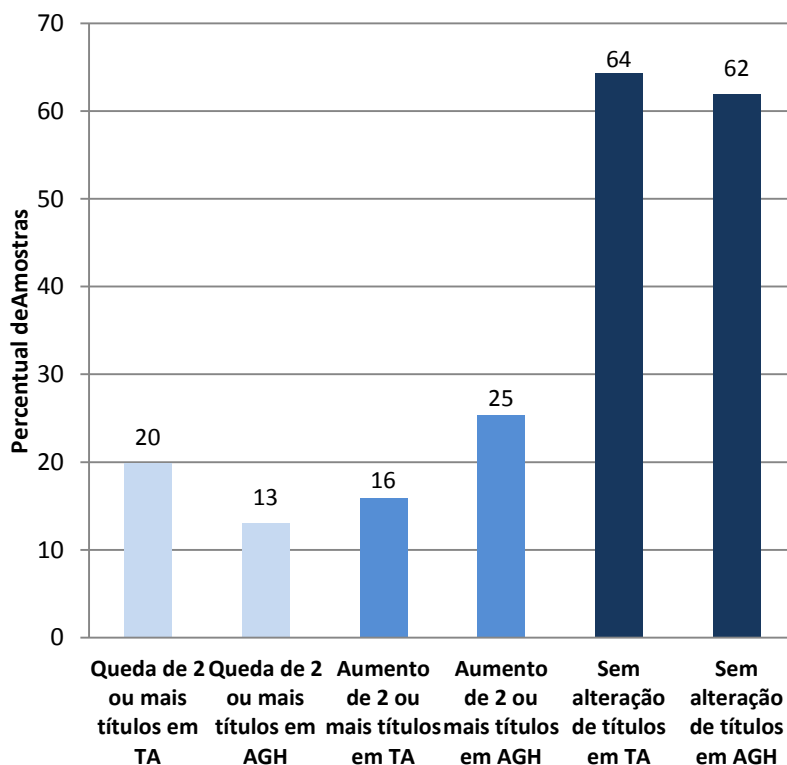


Figura 22 – Distribuição das amostras quanto ao comportamento dos títulos de anticorpos do Sistema ABO analisados e Fase III em relação à Fase I.

5.3.6. Pesquisa de Hemolisinas ABO

Analisando os resultados dos 126 indivíduos da Fase III em relação a Fase I evidenciamos que 65,1% não apresentaram alteração nos resultados de hemolisina, 29,4% passaram a ser considerados Hemolisina Positiva e 5,6% passaram a ser considerados Hemolisina Negativa. Na Pesquisa de Hemolisina A (realizada nos indivíduos do Grupo B e O) e na Pesquisa de Hemolisina B (realizada nos indivíduos do Grupo A e O) 51 (74%) e 78 (68%) dos resultados não sofreram alteração, 4 (6%) e 10 (9%) deixaram de ser positivas, e 14 (20%) e 27 (23%) passaram a ser positivas, respectivamente (Figura 23).

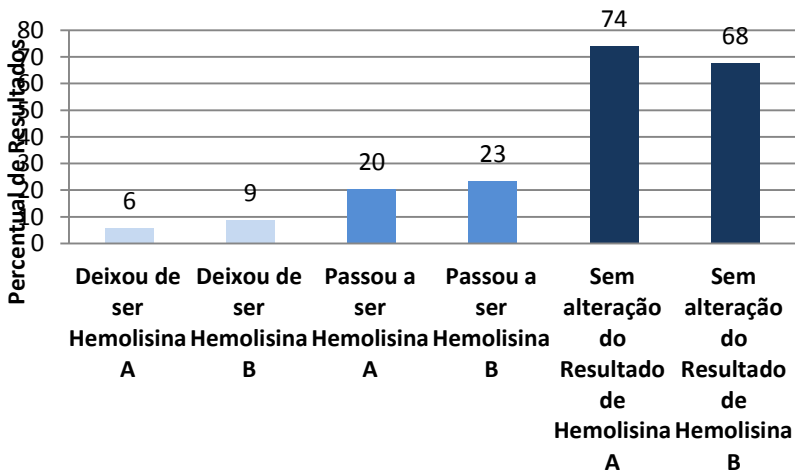


Figura 23 - Comportamento dos resultados da Pesquisa de Hemolisina na Fase III em relação à Fase I.

A Tabela 9 apresenta os resultados que apresentaram alteração de título na fase III em relação à fase I e a intensidade da alteração. Pode ser observado que houve maior variação de títulos nas reações das reações em AGH do que em TA.

Tabela 9. Intensidade de variação dos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B observados em TA e AGH na Fase III em relação à Fase I.

Título	< 8	< 6	< 5	< 4	< 3	< 2	< 1	0	> 1	> 2	> 3	> 4	> 5	> 7
Anti-A Temperatura Ambiente														
n	-	-	-	1	2	5	12	29	14	4	2	-	-	-
Anti-B Temperatura Ambiente														
n	-	-	-	1	4	14	30	37	14	9	5	1	-	-
Anti-A Antiglobulina Humana														
n	-	1	2	-	2	1	10	19	16	11	3	1	3	-
Anti-B Antiglobulina Humana														
n	1	-	-	-	3	9	23	38	22	10	6	1	1	1

Legenda: TA = Temperatura Ambiente; AGH = Antiglobulina Humana; n = número de resultados; <8 a < 1 = Diminuição do respectivo número de título(s); 0 = Sem alteração do título; >1 a >7 = Aumento do respectivo número de título(s); - = Sem Resultados.

5.3.7. Bifidobactérias e pH fecal da Fase III em relação a Fase I

Não houve diferença significativa ($p=0,1909$) entre a quantidade de bifidobactérias fecais na Fase III em relação à Fase I. Da mesma forma, não foi observada diferença ($p=0,9499$) entre o pH fecal na Fase III e na Fase I.

6 DISCUSSÃO

Análise do iogurte

A concentração média de bifidobactérias fornecida foi de $6,67 \times 10^8 \pm 10,3 \times 10^8$ UFC/g de iogurte sendo que encontramos relação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o pH do iogurte. No produto fornecido constava como informação na embalagem que a cada 100 g de iogurte há 10^8 UFC de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, ou seja, a quantidade de bactérias probióticas eram suficientes para trazer efeitos benéficos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

No entanto, diversos fatores podem afetar a viabilidade de bactérias probióticas em iogurtes. Altas concentrações de carboidratos adicionadas ao produto antes da fermentação podem inibir as bactérias do iogurte levando a longos períodos de fermentação e a um baixo desenvolvimento de acidez (OLIVEIRA & Damin, 2003). Estudos demonstraram que as bactérias probióticas têm baixa viabilidade em produtos fermentados (SHAH *et al.*, 2000). Oliveira & Damin (2003) verificaram que o número de bactérias probióticas foi superior ao sugerido pela literatura e se manteve estável após 7 dias de armazenamento. Na análise dos iogurtes verificamos que um dos lotes foi semeado 5 dias antes do vencimento e a quantificação de bifidobactérias foi de apenas $1,0 \times 10^4$ UFC/g de iogurte (resultados não mostrados). Outro lote testamos 6 dias após o vencimento, e encontramos uma concentração de $1,74 \times 10^6$ UFC/g de iogurte (resultados não mostrados). Ou seja, como os indivíduos receberam os iogurtes durante todo o prazo vigente da validade, alguns indivíduos podem não ter recebido quantidade suficiente de bactérias para causar os efeitos benéficos devido a problemas isolados no lote. No entanto, os voluntários foram orientados a continuar o consumo dos probióticos simulando o consumo de produtos comercializados para a população em geral.

Bifidobactérias e pH fecal

Na Fase I os voluntários apresentaram em média $1,01 \times 10^9 \pm 5,79 \times 10^9$ UFC de bifidobactérias por grama de fezes, sendo que houve uma redução dessa média no período de quarentena. Após o uso de probióticos observamos um leve aumento na concentração de bifidobactérias, no entanto não foi significativamente superior à Fase I. O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente esclarecido, embora tenham sido sugeridos vários processos que podem

atuar independentemente ou associados (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004). No entanto, não se sabe ao certo os mecanismos pelos quais os probióticos beneficiam os indivíduos, as propostas são de que os probióticos possuem ação antimicrobiana, competem por recursos nutricionais limitados da biota intestinal, bloqueiam a adesão de patógenos na mucosa intestinal e possuem efeitos anti-toxina dos patógenos (OELSCHLAEGGER, 2010). Outro mecanismo pelo qual as bifidobactérias podem beneficiar a saúde humana é a redução do pH intestinal através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato e lactato), inibindo assim o crescimento de bactérias patogênicas (BIOVATI & MATTARELLI, 2006). Este é um dos mecanismos próprios do sistema digestório para controle populacional e seletividade da colonização bacteriana (CEBRA, 1999).

Embora a literatura afirme que os probióticos possam alterar e regular a biota intestinal, no presente estudo não observamos relação significativa entre o pH fecal e a concentração de bifidobactérias em nenhuma das fases do estudo.

Para que o metabolismo e o conteúdo intestinal possam refletir nas fezes, devem-se levar em consideração as variáveis como a mobilidade intestinal, a ingestão total de fibras, as secreções intestinais, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta, e a duração da intervenção dietética. Neste sentido, o pH fecal pode não refletir com exatidão o pH do cólon (GARRO *et al.*, 2005). Bouhnik e colaboradores (2004) consideraram que o pH fecal pode não ser um bom indicador da acidificação intestinal, uma vez que não observou alteração no pH fecal de 200 voluntários saudáveis que ingeriram carboidratos não digeríveis, mesmo com o aumento no número de bifidobactérias fecais. Búrigo e colaboradores (2007) também não observaram alteração no pH fecal, mesmo com o aumento de bifidobactérias, após a suplementação com fruto-oligossacarídeos em pacientes com neoplasias hematológicas submetidos a quimioterapia.

A quantificação de bifidobactérias nas fezes não foi expressiva após o consumo dos probióticos, podendo estar relacionado com o período curto em que os indivíduos consumiram o iogurte (BOUHNİK *et al.*, 2004; OELSCHLAEGGER, 2010). Um estudo realizado na Argentina com 162 crianças entre 9 meses e 10 anos que receberam durante 4 meses 1 dose diária (95g) de leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* cepa CRL431 (95×10^6 ufc/ml) e *Lactobacillus acidophilus* cepa CRL730 (95×10^6 ufc/ml) somados a oligossacarídeos e inulina (prebióticos) relata que nas fezes coletadas no final do estudo, a *Lactobacillus casei* estava presente em 83% das crianças do grupo

experimental e em menos de 5% das crianças controle (PÉREZ *et al.*, 2010).

A pequena diferença entre a quantidade de bifidobactérias encontrada entre as Fases I e III pode estar relacionada com a concentração administrada visto que autores sugerem que os efeitos dos probióticos são dose-dependentes (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; MACEDO *et al.*, 2009; PÉREZ *et al.*, 2010). No entanto, foi administrada a quantidade recomendada que é um consumo de bactérias probióticas entre 10^6 e 10^{11} UFC/dia, dependendo do efeito benéfico desejado (DAVE & SHAH, 1997; VINDEROLA & REINHEIMER, 2000; HELLER, 2001). De qualquer forma é importante avaliar a relação entre a concentração de bifidobactérias fecais e títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO.

Relação entre Bifidobactérias e Títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO

Não observamos nenhuma relação significativa entre a quantificação de bifidobactérias e título de anticorpos em TA e AGH nas Fases I e II. Durante a Fase III a única correlação significativa encontrada entre bifidobactérias e título de anticorpos foi com anticorpos anti-B em AGH. Pérez e colaboradores (2010) não encontraram diferença significativa dos títulos de anticorpos após o consumo de probióticos e não foi encontrado outros estudos correlacionando o títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e a concentração de bifidobactérias.

Estudos que utilizaram outro gênero de bactéria verificaram títulos de anticorpos do Sistema ABO em 14 adultos e 9 crianças analisando o soro desses pacientes durante apré e pós consumo ou inalação de *Escherichia coli* O⁸⁶ mortas. No estudo verificou-se que os indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos aumentaram os títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO como resposta à ingestão ou inalação de *Escherichia coli* O⁸⁶. Esta resposta foi mais freqüente em pessoas de grupo sanguíneo B do que as do grupo sanguíneo A e O (SPRINGER & HORTON, 1969).

Estudos recentes mostram que há relação significativa entre a quantidade de bactérias do gênero bifidobactéria na cavidade intestinal e Grupos ABO. Os autores verificaram o Grupo O apresentava maior quantidade de bifidobactérias na cavidade intestinal, sendo que o Grupo B possuía mais Lactobacilos. Esse mesmo estudo relata que a

concentração de bifidobactérias nas fezes pode ser diferente entre os fenótipos ABO (MÄKIVUOKKO *et al.*, 2012).

Frequência dos Fenótipos ABO

Embora a frequência dos fenótipos ABO possa variar de acordo com a etnia da população, os resultados encontrados estão de acordo com o previsto em população caucasiana, que varia entre 47 - 42,8% para o Grupo O, 41,9 - 36,4% para o Grupo A, 11 - 9% para o Grupo B e 7,5- 3% para o Grupo AB (MATTOS *et al.*, 2001; DANIELS, 2002; MOLLISON *et al.*; 2005; BORDIN *et al.*, 2007). As frequências dos fenótipos do Sistema ABO tanto na Fase I quanto na Fase II foram semelhantes entre si, assim como a frequência dos gêneros e idades do grupo pesquisado.

Assim como a frequência dos fenótipos ABO, a prevalência de altos títulos de anticorpos do Sistema ABO também pode estar relacionada com a etnia da população estudada (OLAWUMI & OLATUNJI, 2001; MAZDA *et al.*, 2007).

Prevalência dos Títulos de Anticorpos contra antígenos do Sistema ABO

Verificamos que o título mais prevalente de anti-A foi de 1/32 em TA e 1/128 em AGH na Fase I enquanto na Fase II teve um aumento (são significativo) para 1/64 e 1/512, respectivamente. Para o título de Anti-B em TA mais prevalente na Fase I foi de 1/32 e 1/128 em AGH, e na Fase II foi de 1/32 e 1/256, sendo que não esse aumento não foi significativo desses títulos em AGH.

Cooling e colaboradores (2008) ao analisar o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO pela técnica em tubo, em doadores de plaquetas do Grupo O nos EUA, verificaram que o título de Anti-A e Anti-B em TA mais prevalente foi 1/16 e 1/8, respectivamente. Mazda e colaboradores (2007) encontraram este mesmo título de Anti-A mais prevalente (1/16) no Japão e na Tailândia sendo que para o anti-B o título encontrado foi de 1/16. Quando analisaram os títulos em AGH, Mazda e colaboradores (2007) encontraram maior prevalência de títulos de 1/8 e 1/32 para anti-A e 1/32 e 1/256 para anti-B, respectivamente, no Japão e na Tailândia. Um estudo realizado no Brasil (São Paulo) encontrou o título de Anti-A mais prevalente em TA de 1/64 em doadores de sangue (GAMBERO *et al.*, 2004).

Embora não tenham ocorrido aumentos significativos dos títulos em AGH dos anticorpos Anti-A e Anti-B houve o aumento de pelo menos um título entre a Fase I e II em relação aos títulos mais

frequentes. Autores sugerem que o próprio meio ambiente pode estimular a formação de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO (HOFFMAN *et al.*, 2000; OLAWUMI & OLATUNJI, 2001; ROBACK *et al.*, 2008; SIMON *et al.*, 2009; ERHABOR & ADIAS, 2012; KOCHHAR, 2012), pois animais que viveram em ambientes estéreis não os produziram (ERHABOR & ADIAS, 2012). Outros autores sugerem que possa haver estimulação de títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO através da inalação de bactérias (SPRINGER *et al.*, 1969; WU *et al.*, 2006, ANSTEE, 2010).

Embora autores relatem que a questão alimentar possa influenciar na formação dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, uma vez que flora intestinal própria do indivíduo pode estimular o desenvolvimento dos mesmos (DANIELS, 2002; ROBACK *et al.*, 2008), a restrição do consumo de probióticos parece ter sido suficiente para não influenciar significativamente prevalência dos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em nosso estudo.

Após o consumo de probióticos não evidenciamos diferença significativa de títulos de anticorpos Anti-A em TA. O mesmo ocorreu para o título mais prevalente de anti-B que foi de (1/32 para 1/16). Também não houve diferença na prevalência dos títulos de Anti-A e Anti-B em AGH. O estudo realizado por Pérez e colaboradores (2010) não encontrou diferença significativa no título de anticorpos do Sistema ABO em crianças que consumiram probióticos, embora os autores não tenham mencionado as classes dos anticorpos avaliadas (IgM ou IgG). Estudos relatam que os probióticos são capazes de estimular o desenvolvimento de todas as imunoglobulinas, sendo destacada maior eficácia para anticorpos das classes IgG (NG *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010), o que corroboram com os nossos resultados encontrados com Anti-A em AGH.

Autores sugerem que a combinação de vacinas com uso de probióticos pode trazer melhores resultados imunes aos indivíduos devido o aumento de títulos de anticorpos (COPOLLA & GILTURNES, 2004). Outros estudos que avaliaram a resposta de anticorpos do Sistema ABO, sem levar em consideração o uso ou não de probióticos, não evidenciou alteração significativa de títulos de anti-A ou anti-B após a vacinação contra a gripe, embora os voluntários do Grupo O tenham apresentado uma elevação no títulos médios de anticorpos Anti-A e anti-B em TA e em AGH, assim como ocorreu em alguns dos nossos resultados. Os autores não foram capazes de determinar se a vacinação provocou a elevação do título de anticorpos

do Grupo O, pois não foram utilizados testes para detectar citocinas ou células T para determinar se houve alguma outra prova de modulação imunológica. No entanto, os autores levantaram a hipótese de que a vacina da gripe pode desencadear a elavação dos títulos de anticorpos do Sistema ABO sendo necessários mais estudos (DELANEY *et al.*, 2011). Não acreditamos que vacinas prévias realizadas pelos indivíduos antes do nosso estudo possa ter influenciado na prevalência dos anticorpos, visto que esse era um dos critérios de exclusão do estudo. Somado a isso os voluntários foram orientados a não participar de programas de vacinação durante a realização da pesquisa.

A prevalência dos títulos de anticorpos do Sistema ABO em TA e AGH encontrada em todas as fases desse estudo ficou abaixo dos títulos que desencadearam reações transfusionais por incompatibilidade menor de componentes plaquetários. Este autor observou que os títulos em TA sem relatos de reações transfusionais foram iguais ou menores que 1/128, e em AGH iguais ou menores a 1/512 (COOLING, 2007). Outros autores encontraram na literatura reações transfusionais com títulos maiores que 1/100 em TA e 1/400 em AGH (BERSÉUS *et al.*, 2013). No entanto, Daniel-Johnson e colaboradores (2009) descreveram reação transfusional hemolítica por transfusão de componentes plaquetários após doadores terem feito uso de probióticos. Nossos resultados sugerem que o uso de probióticos pode aumentar significativamente ($p=0,0253$) o título de anticorpos Anti-A em AGH, mas não de Anti-B em AGH, pois verificamos que 26% dos resultados de Anti-A em AGH (Tabela 8) apresentaram aumento de dois ou mais títulos. No entanto, observamos que o título mais prevalente de Anti-B em AGH passou de 1/32 para 1/256.

Pérez e colaboradores (2010) não encontraram diferença significativa nos títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B após o uso de probióticos por crianças. Os autores utilizaram no estudo *Lactobacillus acidophilus* cepa CRL730 e *Lactobacillus casei* cepa CRL431. Em nosso estudo foram utilizadas a *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, no entanto não possuíamos informações do fabricante quanto a cepa utilizada. A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estabelecem que cepas de probióticos podem ter efeitos clínicos distintos e que os resultados benéficos com o uso de determinada cepa não pode ser extrapolado para cepas similares, mesmo sendo da mesma espécie (WHO, 2001). Nas reações transfusionais descritas por Daniel-Johnson e colaboradores (2009) os autores não

especificam as cepas e espécies que os doadores de sangue ingeriam antes da doação dos hemocomponentes que tinham altos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, somente especificaram os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacillus subtilis*. Dessa forma não podemos avaliar se as espécies e cepas que aumentaram os títulos desses doadores foram as mesmas que utilizamos em nosso estudo e que em alguns resultados modificaram a prevalência dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO.

A descrição das cepas nos produtos probióticos parece ser importante para avaliação o efeito dos mesmos sobre as mudanças na prevalência dos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO. O estudo realizado por Springer e colaboradores (1961) encontrou essas diferenças entre cepas durante um estudo de inibição de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO. O estudo consistia em realizar a inibição da aglutinação através de diluições seriadas das suspensões das bactérias, sendo que as mesmas eram incubadas com anticorpos anti-A, Anti-B. O estudo com 282 cepas de bactérias dos gêneros *Escheriechia* (135), *Salmonella* (19), *Arizona* (3), *Klebsiella* (42), *Citrobacter* (24), *Pasteurella* (8), *Proteus* (20), *Pseudomonas* (15), *Serratia* (2), *Alcaligenes* (8), *Shigella*(5)e *Herrellea* (1) mostrou que 50% das cepas foram capazes de inibir a ação dos anticorpos anti-A, anti-B e Anti-H. Os autores observaram que embora algumas as bactérias possuíssem os mesmos carboidratos do Sistema ABO, não foram todas as cepas capazes de inibir a ação dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO (SPRINGER *et al.*, 1961).

Uchida e colaboradores (2006) também encontraram diferentes resultados relacionados ao Sistema ABO utilizando a mesma espécie, mas com diferentes cepas. O estudo com 93 cepas de *Lactobacillus* das espécies *L. acidophilus* (47), *L. fermentum* (12), *L. cellobiosus* (7), *L. brevis* (6), *L. buchneri* (6), *L. plantarum* (4), *L. crispatus* (3), *L. gasseri* (2), *L. salivarius* (2), *L. johnsonii* (1), *L. lindneri* (1), *L. para. Paracasei* (1) e *L. raffinolactis* (1) foi realizado com o intuito de caracterizar os antígenos ABO como ligantes para estas espécies. Determinadas cepas ligaram-se fortemente aos trissacarídeos A, dentre elas destaca-se o *L. acidophilus* OLL2976. Os autores sugeriram que o reconhecimento do antígeno A é de acordo com cepas específicas e não espécie específica (UCHIDA *et al.*, 2006).

Mäkivuokko e colaboradores (2012) evidenciaram que há diferença na quantidade de espécies de bifidobactérias contidas na cavidade intestinal em diferentes Grupos ABO. Na espécie *B. Bifidum*,

aproximadamente 45% dessas bactérias na cavidade intestinal de indivíduos do Grupo O, sendo que para a espécie *B. Adolescentis* o percentual era de aproximadamente 75% no mesmo Grupo. No estudo os autores também encontraram essa diferença de bifidobactérias com o Grupo B. Os resultados desse estudo mostram que há uma relação direta entre a flora intestinal e Grupos ABO.

No trabalho realizado por Uchida e colaboradores (2006) os autores levantaram a hipótese de que algumas cepas de *Lactobacillus* reconhecem e se ligam ao mesmo receptor que alguns agentes patogênicos e dessa forma podem evitar a infecção desse através da ligação ao receptor por competição de antígenos do Sistema ABO, melhorando assim a saúde do indivíduo. No trabalho os autores mencionam que não está claro se o *Lactobacillus* reconhece monossacarídeo terminal ou toda a sequência dos antígenos A ou B, no qual incluem os tipos de substância percutânea. É possível que outros componentes da mucina, tais como as cadeias de carboidratos, o ácido siálico e proteínas, podem ser responsáveis pela intensidade da aderência das bactérias na mucosa (UCHIDA *et al.*, 2006).

Analisando individualmente os resultados das Fases I e III evidenciamos indivíduos com aumento de no mínimo 2 títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, embora estatisticamente não tenha sido significativo, exceto com Anti-A em AGH e Anti-B em TA. A hipótese de probióticos utilizarem antígenos ABO da mucosa intestinal como um dos ligantes para fazer seu efeito justifica porque alguns indivíduos tiveram um aumento significativo de títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e outros não. Sabe-se que antígenos ABO estão presente, não somente nos eritrócitos, mas também nos tecidos, inclusive na cavidade intestinal (DANIELS, 2002; ROBACK *et al.*, 2008).

Através da análise molecular das cepas *L. brevis* OLL2772, *L. gasseri* OLL2787, *L. salivarius* OLL2789 e *L. acidophilus* OLL2802, verificou-se que a proteína S-layer de 48 kDa codificada pelo gene *slpA* da cepa *L. brevis* ATCC8287T é possivelmente a proteína ligante com o antígeno A da mucosa intestinal (UCHIDA *et al.*, 2006).

Os resultados de Springer e colaboradores (1961) também apontaram diferenças entre os Grupos ABO, sendo que 50% das cepas estudadas foram capazes de inibir a ação dos anticorpos anti-A, anti-B e Anti-H (Grupos A, B e O, respectivamente). Dentre as cepas estudadas a inibição do anticorpo anti-H (Grupo O) foi o que mais prevaleceu, seguido do anti-B (Grupo B) (SPRINGER *et al.*, 1961). Através da análise da Tabela 7, podemos observar que há diferença de títulos

considerados críticos nos diferentes Grupos ABO, sendo que o aumento de títulos prevaleceu mais em Grupo O seguido do Grupo A (Tabela 9).

Em nosso estudo não realizamos a avaliação molecular dos probióticos para evidenciar se as bactérias possuíam a proteína S-layer ou mesmo se houve mudanças de cepas em diferentes lotes. Autores sugerem que não basta somente a bactéria possuir os antígenos ligantes ABO, mas também as estruturas precursoras dos antígenos ABO contidas na mucosa intestinal podem variar entre pessoas do mesmo grupo sanguíneo. Atualmente são descritos 6 tipos de substâncias precursoras: Tipo 1: Gal β 1->3GlcNAc β 1-> R; Tipo 2: Gal β 1->4GlcNAc β 1-> R; Tipo 3: Gal β 1->3GalNAc α 1-> R; Tipo 4: Gal β 1->3GalNAc β 1-> R; Tipo 5: Gal β 1->3Gal β 1-> R e Tipo 6: Gal β 1->4Glc β 1-> R. Embora haja essa diversidade de substâncias precursoras, o radical (R) será fundamental na determinação do antígeno final, no caso do Sistema ABO a presença da L-Fucose (Grupo O), associada ou não com a D-galactose (Grupo B) ou N-D-Acetilgalactosamina (Grupo A) (SCHENKEL-BRUNNER, 2000; KOCHHAR, 2012).

Em nosso estudo não avaliamos se as cepas utilizadas possuíam carboidratos presentes nas porções precursoras, antígenos ABO capazes de estimular o aumento de títulos desse Sistema Sanguíneo, a isomeria desses antígenos, assim como não analisamos se a mucosa intestinal dos voluntários possuíam antígenos ABO. Schenkel-Brunner (2000) observou antígenos enantiômeros humanos do Grupo A presentes nas mucosas gástricas. Stowell e colaboradores (2010) comprovaram *in vitro* que bactérias como *Escherichia coli* O⁸⁶ possuem hidratos de carbono dos Sistemas ABO, H e Lewis (antígenos ABH). *E. coli* e algumas espécies de *Salmonella* e *Arizona* também possuem quase todos os carboidratos ABO em suas membranas plasmáticas: D-galactose, L-fucose e N-acetil-D-galactosamina (exceto N-acetil-D-glucosamina). No entanto, não basta haver somente o monossacarídeo na bactéria para estimular o desenvolvimento dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, mas o mesmo deve ser um carboidrato ativo, visto que somente um dos enantiômeros do monossacarídeo é imunogênico (SPRINGER *et al.*, 1961).

Essa diferença físico-química dos carboidratos do Sistema ABO presentes nas bactérias poderia justificar porque houve uma diferença significativa com títulos de anticorpos anti-A, mas não com anti-B em AGH. Isto porque o anti-A é um anticorpo dirigido contra antígenos, no qual possuem carboidratos n-D-Aceti-galactosamina terminais, sendo que o Anti-B é dirigido contra a D-galactose (YAMAMOTO, 2004;

ROBACK *et al.*, 2008; STORRY & OLSSON, 2009; GIRELLO & KÜHN, 2011). Não avaliamos se os carboidratos das bactérias utilizadas nesse estudo possuíam n-D-Acetil-galactosamina ou n-L-Acetil-galactosamina, mas caso fossem essas as presentes, justificaria a ausência de um aumento significativo na prevalência de anticorpos Anti-B em AGH, visto que esse carboidrato seria inativo. Essa suspeita aumenta pelo fato de ter ocorrido uma diminuição significativa no título de anticorpos Anti-B em TA, assim como uma diminuição na prevalência desse anticorpo, o que sugere que houve uma diminuição na exposição recente à esses antígenos.

Embora 62% das amostras não tenham alterado títulos em AGH, verificamos que 25% aumentaram 2 ou mais títulos após o consumo de probióticos. Os mecanismos que tornam as bactérias imunogênicas vão além das questões físico-químicas dos antígenos ABO das bactérias já mencionados. Autores acreditam que existam outras moléculas como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicóicos que são comumente encontradas na superfície de microrganismos e constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos que são capazes de ativar a resposta imune inata nos indivíduos (CRUVINEL *et al.*, 2010). As lectina ligante de manose (MBL) liga-se a grande variedade de açúcares como N-acetil-D-glucosamina, manose, N-acetil-manosamina, L-Fucose e glucose, expressos por diferentes microrganismos e estruturas, mediando a fagocitose e a ativação do complemento. Uma vez que pode ligar-se a vários açúcares, a MBL atua efetivamente como um anticorpo universal (CARVALHO *et al.*, 2007). Um estudo publicado na *Nature Medicine* em 2010 provou que bactérias que expressam os mesmos carboidratos presentes nos antígenos ABH eritrocitários, são mortas por lectinas (MBLs) produzidas naturalmente pelo sistema imune inato. O estudo comprovou que as galactinas (MBLs) se ligam às *Escherichia coli* O⁸⁶, alterando sua morfologia, tornando a membrana mais frágil e desta forma matando as bactérias. No entanto, as galactinas só tem ação quando há a presença de antígenos ABO na superfícies das bactérias, sendo que Grupo O tem uma melhor eficácia da resposta imune. Os autores puderam comprovar também que as galactinas (presentes em indivíduos dos Grupos A e B) são capazes de aderir às cepas de *Escherichia coli* O⁸⁶, mas não às Gram Negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e Gram Positivas (*Staphylococcus aureus*). Os autores sugerem que as galectinas podem afectar a composição de múltiplas populações de bactérias intestinais, modulando assim o microbioma intestinal com auxílio dos antígenos ABO presentes na flora intestinal (STOWELL *et al.*, 2010).

O estudo de Stowell e colaboradores (2010) não avaliou as bifidobactérias, sendo que nosso estudo também não levou em consideração a presença ou não dessas lectinas no Grupos A, B e O. O estudo realizado por Wu e colaboradores (2006) também encontrou uma maior relação entre lectinas com Grupo O, do que com o Grupo A e B. O estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* mostrou que lectinas (MBLs) presentes nas bactérias são 1.0×10^4 vezes mais ativas com a L-Fucose (Grupos O), do que com a N-Acetil-D-Galactosamina (Grupo A) e D-Galactose (Grupo B). Suspeita-se que a *P. aeruginosa* liga-se a receptores específicos (hidratos de carbono de antígenos ABH) nas mucosas respiratórias e que esse é um passo crítico na patogênese da infecção (WU *et al.*, 2006). Não podemos afirmar se lectinas presentes nos indivíduos A e B foram capazes de matar as *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lacti*, assim como descrito por Stowell e colaboradores (2010) e WU e colaboradores (2006), no entanto, podemos observar que os maiores títulos foram encontradas no Grupo O, conforme preconiza a literatura (DANIELS, 2002; ROBACK *et al.*, 2008).

Embora haja estudos relacionando a ligação de microrganismos à mucosa intestinal através da interação com antígenos do Sistema ABO, outros não encontraram nenhuma relação com os antígenos ABO (WU *et al.*, 2006; PERRY *et al.*, 2007; STOWELL *et al.*, 2010). Um estudo com indivíduos com resultados negativos (G-) e positivos (G+) para gonorreia verificou que os antígenos ABO não são fatores predisponentes à infecção por *N. Gonorrhoeaec* (PERRY *et al.*, 2007).

Os títulos prevalentes de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em TA e AGH encontrados em todas as fases desse estudo foi menor que os títulos que desencadearam reações transfusionais por incompatibilidade menor por transfusão de componentes plaquetários (COOLING, 2007).

Para os anticorpos anti-B em TA na Fase I verificamos que antes do uso de probióticos os títulos encontrados estavam de acordo com o estudo de Gambero e colaboradores (2004) que encontraram uma prevalência de 1/32. No entanto, após a ingestão dos iogurtes probióticos o título desses anticorpos ficou abaixo do preconizado por Gambero e colaboradores (2004).

Embora não possamos explicar os mecanismos que levaram a alteração da prevalência dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, nossos resultados sugerem que o uso de probióticos pode diminuir o título de anticorpos Anti-B da classe TA, pois verificamos que 17%

dos resultados (Tabela 11) diminuíram dois ou mais títulos, e aumentar os títulos de Anti-A em AGH. Além das observações realizadas na prevalência dos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO analisamos também os intervalos (variação) dos mesmos em cada fase desse estudo.

Intervalo dos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO

Os títulos de anti-A em TA na Fase I variaram de 1/8 a 1/512, sendo que houve um intervalo maior para o Anti-B (1/2 a 1/1024). Na Fase II o intervalo dos anticorpos anti-A encontrados foi 1/16 a 1/256, sendo semelhante ao de anti-B (1/8 a 1/256). Cooling e colaboradores (2008) encontraram títulos de Anti-A em TA de 1/2 a 1/64 e de 1/2 a 1/32 para Anti-B em doadores de plaquetas. Mazda e colaboradores (2007) encontraram títulos de anticorpos Anti-A em TA de 1/8 a 1/64 e 1/2 a 1/64 de Anti-B no Japão. Já na Tailândia o intervalo foi o mesmo para Anti-A e Anti-B (1/4 a 1/256) (MADZA *et al.*, 2007). Entre hemocomponentes de doadores que desencadearam Reações Imuno-hemolíticas foram relatados títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em TA de 1/128 a 1/16384, sendo que para anti-B foi de entre 1/512 e 1/4096 (COOLING, 2007). Nossos resultados mostraram que os intervalos de títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em TA nas Fases I e II foram maiores que os encontrados por Cooling e colaboradores (2008) e Mazda e colaboradores (2007) e semelhantes aos descritos na literatura brasileira (GAMBERO *et al.*, 2004).

Os títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B em AGH apresentaram variação maior quando comparada com TA, tanto na Fase I quanto na Fase II. No Japão essa variação de anti-A em AGH foi entre 1/2 e 1/32 e entre 1/2 e 1/512 na Tailândia (MADZA *et al.*, 2007) sendo que na Fase I encontramos variações de 1/8 a 1/16384 e na Fase II de 1/32 a 1/4096. Os intervalos de títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO que encontramos nessas fases possuía títulos anticorpos anti-A em AGH que desencadearam reações transfusionais em pacientes que receberam hemocomponentes com alto títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO (1/1024 a 1/32000) (COOLING, 2007). Pierce e colaboradores (1985) relataram uma reação transfusional em um paciente do Grupo B em que o Anti-B, reativo com AGH possuía título de 1/16348. No entanto, outros autores já evidenciaram reações transfusionais com títulos de Anti-B reativos com AGH em títulos menores (1/4096) (REIS & COOVADIA, 1989), mesmo título

encontrado dentro da Fase I com anticorpos Anti-B em AGH (1/4 a 1/4096).

A ocorrência de maior variação de títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B na fase de AGH entre as fases pode estar relacionada à presença de amostras do Grupo O, visto esse fenótipo ABO possui anticorpos Anti-AB da classe IgG, reativos com AGH (DANIELS, 2002; ROBACK *et al.*, 2008; GIRELLO & KÜHN, 2011). Esta análise se confirma ao observarmos a Tabela 7, visto que 94,8% das amostras do Grupo O possuem títulos maiores que 1/128 em AGH e 56,9% em TA. Títulos elevados também podem estar associados a imunização prévia com vacinas anti-tetânicas, anti-diftéricas e imunizações devido a incompatibilidade ABO materno-fetal (DANIELS, 2002; ROBACK *et al.*, 2008).

Na Fase III observamos que os intervalos de títulos de anticorpos anti-A em TA foram iguais ao da Fase I, sendo que os de Anti-B foram inferiores na Fase III quando comparados com a Fase I. Dessa forma podemos sugerir que o consumo de probióticos não alterou o intervalo de títulos de anticorpos anti-A em TA, mas sim de Anti-B, embora ambos tenham permanecendo dentro da variação encontrada por Gambero e colaboradores (2004). Já a variação dos títulos de anticorpos anti-A em AGH da Fase III foram iguais aos da Fase I, no entanto houveram mais amostras com títulos de 1/1024, 1/2048 e 1/4096 na Fase III do que na Fase I. Dessa forma podemos sugerir que o consumo de probióticos aumentou a variação do título de anticorpos em AGH. Esse mesmo aumento da variação observamos com os títulos de anticorpos Anti-B em AGH. Esse aumento do intervalo de títulos ABO em AGH pode estar relacionado com o aumento de amostras que passaram a ter títulos maiores em AGH após o consumo de probióticos. Esse resultado vai ao encontro de outros estudos que evidenciaram o aumento de IgG em indivíduos que consumiram produtos com probióticos (NG *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010). Fung e colaboradores (2007) relataram reações transfusionais ocasionadas por transfusões de componentes plaquetários com títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO semelhantes a esses encontrados na fase III.

Por outro lado, Daniel-Johnson e colaboradores (2009) evidenciaram títulos de anti-B em AGH que desencadearam reações transfusionais através de doadores que consumiram probióticos, e que foram superiores aos intervalos encontrados nesse estudo.

Analisando a Tabela 9, podemos verificar indivíduos que isoladamente aumentaram mais que dois títulos após o consumo de

probióticos. Essa observação de que indivíduos isoladamente tiveram aumento significativo de anticorpos também foi feita por Springer e colaboradores (1969).

A influência de probióticos sobre os títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO além de poder estar relacionada a questões físico-químicas dos antígenos, antígenos presentes nas bactérias e cepas específicas, podem também estar relacionado a outros Sistemas Sanguíneos. Os antígenos do Sistema ABO e do Sistema H, que em conjunto são chamados de ABH, são influenciados por genes secretores (FUT2 e FUT3) aos quais pertence ao Sistema Sanguíneo Lewis (Le). Estes genes codificam enzimas que adicionam carboidratos em substâncias percursoras já formadas na mucosa intestinal. Estes genes são independentes dos genes ABO, sendo que 77-80% da população caucasiana é considerada secretora, ou seja a presença do antígeno Le^b (ROBACK *et al.*, 2008; GIRELLO & KÜHN, 2011). O estudo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* revelou que as lectinas (MBLs) reagem mais fortemente com carboidratos purificados dos antígenos Le^a do que com antígenos ABO, suspeitando-se assim que a *P. aeruginosa* liga-se a receptores específicos nas mucosas respiratórias, sendo um deles hidratos de carbonos também do Sistema Lewis (WU *et al.*, 2006). Estudos com diferentes cepas evidenciaram uma maior afinidade de ligação da *H. Pylori* com o fenótipo O Le^{b+} quando comparado com o fenótipo A Le^{b+} (aproximadamente 5 vezes maior). Os autores acreditam que a *H. Pylori* deve se ligar a antígenos ABH da cavidade gástrica para realizar sua infecção nos indivíduos (ANSTEE, 2010).

Estudo recente demonstra que a substância precursora Tipo 2: Gal β 1->4GlcNAc β 1-> R, a mais comum dentre os 6 tipos existentes e que faz parte dos antígenos ABH, está presente em diversas partes da mucosa intestinal de ratos. O estudo que utilizou 2 grupos de ratos (um com e outro sem a expressão da β -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferase Tipo 2 na mucosa intestinal), evidenciou que há uma alteração da biota intestinal de animais que expressam a β -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferase Tipo 2 quando comparado com o grupo que não expressa a enzima. Os autores verificaram que a expressão da enzima nas diversas porções do órgão, pode resultar em diferentes concentrações e diversidade de bactérias da biota intestinal. Os autores puderam concluir que a enzima glicosiltransferase β -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferase Tipo 2 é responsável pela formação dos antígenos ABH, e também por alterar a biota intestinal de ratos, visto que na ausência dessa, os antígenos ABH não são formados podendo tornar

esses indivíduos mais suscetíveis a adquirir infecções intestinais (STAUBACH *et al.*, 2012).

A relação entre os antígenos Le^a e aumento de títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO não pode ser confirmada visto que não avaliamos a presença dos mesmos nas amostras dos voluntários, embora a literatura demonstre que há relação entre bactérias e esse antígenos (WU *et al.*, 2006). Mäkivuokko e colaboradores (2012) também verificaram que há relação entre a quantidade de bifidobactérias contida na flora intestinal e os antígenos secretores do Sistema Lewis. Outro estudo realizado com 82 indivíduos saudáveis que mantiveram a mesma dieta, sendo que suspenderam o consumo de probióticos 7 dias antes da coleta de amostras fecais e de sangue encontraram a mesma relação significativa. Nesse estudo os autores verificaram que a houve diferença significativa na quantidade e diversidade de bifidobactérias entre os indivíduos secretores e não secretores, sendo menor nos não secretores. Os autores acreditam haver forte relação entre a aderência dessas bactérias na cavidade intestinal e antígenos ABH (WACKLIN, *et al.*, 2011). Acreditamos que estudos futuros possam realizar essa análise, de forma que possamos identificar se o aumento de títulos de anticorpos anti-ABO está relacionado não somente a esses antígenos ABO, mas também com a de outros Sistema Sanguíneos. Uchida e colaboradores (2006) também suspeitam que a adesão de bactérias na biota intestinal possa estar envolvida também com outros carboidratos também presentes nos tecidos intestinais. Embora as associações de grupos sanguíneos com doenças permaneçam tentadoras, no estudo realizado com *Neisseria gonorrhoea* não foi verificada relação significativa desses organismos com antígenos ABO e Lewis (PERRY *et al.*, 2007). Tabasum & Nayak, (2011) verificaram que bactérias que causavam periodontites não utilizavam antígenos ABH secretores para se fixar a cavidade oral. Os fenótipos ABO podem estar relacionados com algumas doenças, assim como o título de anticorpos pode estar associado com a idade dos indivíduos (ROBACK *et al.*, 2008)

Relação título de anticorpos e idade dos indivíduos

França e colaboradores (2011) observaram menores títulos de anticorpos anti-A em doadores do Grupo O do gênero masculino com menos de 30 anos quando comparado com mulheres da mesma faixa etária. Em homens com mais de 50 anos, os títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B foram menores, sendo que os títulos de anticorpos anti-B TA acima de 1/128 prevaleceu em mulheres. Os títulos de anticorpos anti-B

em TA acima de 1/128 prevaleceu em mulheres entre 19 e 29 anos, quando comparado com homens da mesma idade (FRANÇA *et al.*, 2011). Divergentemente, outros estudos com doadores do Grupo O não evidenciaram relação entre a idade e a prevalência de títulos elevados de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, nem mesmo quanto a presença de hemolisinas ABO (TOVEY, 1958; OLAWUMI & OLATUNJI, 2001; KHAMPANON, 2012). Nossos resultados também não evidenciaram relação entre a idade e o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO na Fase I e Fase III (exceto anti-B em TA). Os nossos resultados, divergentes dos de França e colaboradores (2011), podem estar relacionados com a estratificação de dados, pois os autores estratificaram o gênero e as idades entre 19-29, 30-39, 40-49 e mais de 50 anos. Além disso, utilizamos amostras dos Grupos O, A e B, o que pode ter aumentado a diferença no número de resultados entre Anti-A e Anti-B, sendo que os demais estudos analisaram somente o Grupo O, ou seja, o número de resultados de Anti-A é igual ao número de anti-B (FRANÇA *et al.*, 2011).

No entanto, observamos assim como França e colaboradores (2011) que indivíduos com mais de 40 anos apresentaram baixos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO na Fase I. Porém, após o uso de probióticos verificamos que parte dos voluntários com mais de 40 anos passaram a apresentar títulos de anticorpos Anti-A e Anti-B altos, principalmente nas reações com uso de AGH (Figuras 5 e 19), sendo alguns maiores que 1/2048 e, parte dos indivíduos permaneceram com títulos baixos (1/4). Os indivíduos que possuíam títulos de anti-B em AGH de 1/4096 na Fase III tinham 44 e 65 anos, sendo que na Fase I era um indivíduo com 34 anos (Figura 19). Um único indivíduo de 51 anos que possuía título elevado na Fase I (1/16384) manteve o mesmo título após o uso de probiótico.

O fato dos indivíduos com mais de 40 anos, que ingeriram probióticos, terem aumentado o título de anticorpos nas reações com AGH, vai ao encontro dos relatos de pesquisas que mencionam o aumento de Imunoglobulina G após consumo de probióticos (NG *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010). Isto porque as titulações de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO utilizando AGH realizadas neste estudo, tem como finalidade detectar anticorpos da classe IgG. A relação do aumento de títulos de anticorpos IgG com a idade após o consumo de probióticos corrobora com o estudo de Pérez e colaboradores (2010) que observou que crianças entre 9 meses a 10 anos de idade não apresentaram aumento do título de anticorpos da classe IgG após o uso de leite fermentado contendo probióticos. O relato de reação transfusional

ocasionada pela doação de sangue de um doador que consumia probióticos demonstra que o mesmo possuía 69 anos sendo que seu título de anti-B era de 1/16384 (DANIEL-JOHNSON *et al.*, 2009). Da mesma forma, os resultados de Springer & Horton (1969) que estimularam os anticorpos contra antígenos do Sistema ABO através da ingestão de *Escherichia coli* O₈₆, verificaram aumento maior nos títulos de adultos (por ex. um indivíduo de 69 anos passou de 1/32 para 1/256 na leitura das reações com AGH), do que em crianças (por ex. com 35 semanas de vida, o título passou de 1/2-4 para 1/8). Embora os maiores títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO sejam encontrados em crianças entre 7 – 10 anos e que após os 65 anos de idade estes títulos podem ser diminuídos, nossos resultados sugerem que o uso de probióticos por indivíduos com mais de 40 anos pode manter elevado o título desses anticorpos (ROBACK *et al.*, 2008; GIRELLO & KÜHN, 2011). Embora não haja consenso na literatura quanto ao título que deva ser considerado elevado para as transfusões de componentes plaquetários autores encontraram títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO muito acima dos limites críticos estabelecidos pelo NHSBT (DANIEL-JOHNSON *et al.*, 2009).

Percentual de amostras consideradas críticas de acordo com os diferentes títulos críticos

Verificamos, utilizando os títulos críticos recomendados pelo NHSBT, que houve um aumento no percentual de indivíduos com títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO da classe IgG considerados críticos após fazer uso de probióticos (Tabelas 3 e 8), quando comparado com a Fase I. Vicente e colaboradores (2011) não observaram diferença no título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em 8 indivíduos que ingeriram probióticos.

Evidenciamos também que os indivíduos do Grupo O apresentaram mais títulos críticos, de acordo com o NHSBT, tanto antes como depois do uso de probióticos. Dentre os 67 indivíduos do Grupo O recrutados inicialmente neste estudo encontramos uma frequência de 37% (resultados não mostrados) de indivíduos que possuíam altos títulos de IgM ($\geq 1/128$) e AGH ($\geq 1/256$). Um estudo realizado em uma população caucasiana (Itália) evidenciou que 27,7% dos doadores O foram considerados “O Perigoso” e que 17,2% apresentam anticorpos hemolíticos com título superior a 1/100 (DE BARTOLO *et al.*, 1977). Estudos com Nigerianos encontraram uma frequência ainda maior, sendo 47,9% dos indivíduos com títulos críticos de Anti-A e Anti-B

(OKAFOR & ENEBE, 1985). Em território brasileiro a frequência de doadores de sangue do grupo sanguíneo O com títulos IgM críticos acima de 1/100 foi de 1,2% em Itapeva, 5,3% em Ourinhos, 7,3% em Guarapuava e 12,8% em Botucatu (GRAMBERO, 2004; COSECHEN & MONTEIRO, 2008; FERNANDES *et al.*, 2008). Essa frequência inferior pode estar atribuída a técnica utilizada nos estudos (microplaca), sendo que nosso estudo foi realizado em tubo, visto que esta técnica é considerada clássica na imuno-hematologia (VOAK, 1999; JUDD *et al.*, 2008). Os critérios adotados pelo NHSBT proporciona um menor percentual de indivíduos considerados com títulos críticos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO, havendo maior possibilidade de transfusão de hemocomponentes plaquetários não isogrupos. Neste sentido, no Brasil é recomendada a transfusão de componentes plaquetários isogrupos quando os doadores apresentarem títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO elevados. No entanto, a própria legislação em vigor está em contrassenso visto que a mesma também recomenda a realização da Pesquisa de Hemolisina (BRASIL, 2011 (a); WIIN, 2012).

Frequência de Hemolisina Positiva

A frequência de amostras consideradas Hemolisina Positiva entre os voluntários na Fase I foi de 49,2%, sendo que entre doadores de plaquetas por aférese (Grupo A, B e O) de Santa Catarina foi de 46,88% (GERALDO, 2012). Okafor e Enebe (1985) encontraram uma frequência de Hemolisina B Positiva no Grupo A de 35,7% e de 8,8% de Hemolisinas A Positivas no Grupo B, resultados inferiores ao encontrados em nosso estudo na Fase I.

Ao analisarmos somente as amostras do Grupo O da Fase I, encontramos uma frequência de Hemolisina Positiva de 78,9% entre os voluntários. Um estudo com 11.480 doadores de sangue da Nigéria encontrou uma frequência de 46,9% (KULKARNI *et al.*, 1985). Semelhante ao nosso estudo, na Índia foi observada uma frequência de 82,88% de hemolisinas positivas entre doadores do grupo O, através da técnica em tubo (MATHAI, 2003). Um estudo com doadores do Grupo O de Florianópolis encontrou uma frequência de 62,92% de Hemolisina Positiva (GERALDO, 2012). Khampanon e colaboradores (2012) também encontraram uma frequência alta (69%) em doadores Tailandeses do Grupo O. A frequência de Hemolisinas Positivas encontrada por Silva e colaboradores (2006) em amostras do Grupo O foi de 11,9% entre 218 doadores no Estado do Rio de Janeiro. Contudo, os próprios autores sugerem estudos com um número maior de amostras.

Outro estudo que utilizou a técnica em tubo encontrou uma frequência de amostras do Grupo O com Hemolisinas Positivas de 23,2% (OLAWUKI & OLATUNJI, 2001). Embora a técnica em tubo seja considerada a técnica de referência, autores que realizaram a Pesquisa de Hemolisina através da técnica em microplaca, verificaram dentre 493 amostras de doadores brasileiros do grupo O, 41,58% de hemólise (CAMPOS et al., 2009). Kagu e colaboradores (2011) encontraram uma frequência de Hemolisinas A e B Positivas de 32,5% em indivíduos do Grupo O, sendo também inferior ao encontrado em nosso estudo.

Entre as Hemolisinas Positivas do Grupo O, 20,0% foram somente Hemolisinas A e 17,8% somente Hemolisinas B. Silva e colaboradores (2006) encontraram no Rio de Janeiro uma frequência de 10,1% e 7,3% de resultados de Hemolisinas Positivas A e B, respectivamente, em amostras do Grupo O. No entanto, os autores utilizaram a técnica de microplaca, o que poderia justificar a diferença de frequência encontrada em relação ao nosso estudo.

Analizando isoladamente a frequência de Hemolisinas Positivas, verificamos que nossos dados estão próximos aos encontrados em doadores de Santa Catarina (GERALDO, 2012). Entretanto, há uma maior diferença na frequência dos resultados do nosso estudo em relação aos doadores catarinenses quando analisado isoladamente o Grupo O. Essa maior frequência pode estar relacionada com a utilização em nosso estudo de reagentes de hemácias comerciais, visto que a técnica estabelecida por Oliveira & Góes (1999) preconiza a utilização de suspensões de hemácias preparadas previamente para a Pesquisa de Hemolisinas. O preparo prévio é recomendado pelo motivo de que estas células permanecem com sua característica biomecânica e estrutura membranar íntegra, uma vez que células contidas em soluções preservantes podem causar danos nos eritrócitos, principalmente oxidativos devido a estocagem, tornando assim as membranas celulares mais frágeis. Sendo as membranas mais frágeis a hemólise dessas células poderiam ocorrer com maior facilidade *in vitro*, não correspondendo assim a hemólise *in vivo* (KRIEBARDIS et al.; 2008, ANTENELOU et al.; 2010). Embora a legislação em vigor não estabeleça o tipo de suspensão de hemácias que deva ser utilizada na Pesquisa de Hemolisinas, nossos resultados sugerem que é fundamental que as suspensões de hemácias utilizadas sejam de acordo com Oliveira & Góes, (1999). Contudo, para que a instituição hemoterápica possa realizar a Pesquisa de Hemolisina utilizando suspensões *in house*, preparadas previamente, o estabelecimento deve obter autorização da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011 (a)).

A frequência de Hemolisina Positiva entre as 41 amostras na Fase II foi de 41,5%). Essa diferença encontrada na Fase II em relação à fase I pode ser atribuída ao número inferior de amostras utilizadas no período de quarentena, assim como a alta frequência de Hemolisina A positivas encontradas no Grupo B, visto que havia apenas duas amostras desse grupo. A menor frequência de Hemolisina Positiva na Fase II também pode estar relacionada ao fato de que estes voluntários ficaram 4 meses sem ingerir produtos contendo probióticos, o que sugere que pode haver uma diferença proporcional ao período de restrição de iogurtes. Não encontramos estudos para comparação que avaliassem a variação biológica natural dos Títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO ou resultados de hemolisinas em humanos. As alterações encontradas nesse período de quarentena podem estar atribuídas também ao próprio meio ambiente, visto que ele próprio pode deixar de estimular o desenvolvimento de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO (HOFFMAN *et al.*, 2000; ROBACK *et al.*, 2008; SIMON *et al.*, 2009; ERHABOR & ADIAS, 2012; KOCHHAR, 2012). Embora os voluntários tenham sido orientados a não alterar a sua dieta, as alterações encontradas nos resultados de Hemolisinas Positivas pode estar relacionada com a ingestão de alimentos de origem animal visto que esses podem auxiliar no desenvolvimento dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO (KOCHHAR, 2012). Em geral, a frequência de Hemolisinas Positivas no Grupo O vem aumentando ao longo dos anos (OLAWUKI & OLATUNJI, 2001; KAGU *et al.*, 2011).

Na Fase III a frequência de amostras com Hemolisinas Positivas foi de 41,7%. Observamos que a frequência encontrada na Fase III foi semelhante à encontrada entre os doadores do Estado de Santa Catarina (46,88%) (GERALDO, 2012), embora os doadores não tenham sido questionados quanto ao uso de probióticos.

Após o consumo de probióticos verificamos que houve uma diminuição de voluntários com Hemolisinas Positivas (de 49,2% para 41,7%) entre os Grupos A, B e O. No entanto, entre os Grupos O e A a frequência passou de 78,9% para 84,2% e de 21,1% para 42,1%, respectivamente após o consumo de probióticos. A frequência de resultados de Hemolisinas A e B que passaram a ser Positivas na Fase III foi de 20% e 23%, respectivamente (Figura 23). Entre os resultados de Hemolisinas, podemos observar que a Pesquisa de Hemolisinas B foi a que mais sofreu influência da restrição (Fase II) e uso dos probióticos (Fase III) (Figuras 6 e 20). Outros autores que evidenciaram mudanças

no comportamento de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em países orientais relatam que a alimentação dos países em desenvolvimento pode influenciar no comportamento dos anticorpos contra antígenos do Sistema ABO. Os autores atribuem essa mudança a uma maior ingestão de alimentação ocidental que consiste basicamente de alimentos industrializados (MADZA, 2007). Pelo fato de não haver consenso na literatura quanto ao método que deva ser utilizado nos doadores de sangue realizamos também a comparação entre os dois métodos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011(a)).

Comparação entre Título de Anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e Pesquisa de Hemolisina

Dentre as 126 amostras analisadas na Fase I observamos que 49,2% foram Hemolisina Positivas, e caso estes fossem doadores, seus hemocomponentes deveriam ser transfundidos isogrupo. Se o critério adotado fosse a titulação $\geq 1/64$ em TA, o percentual de voluntários com altos títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO seria de 57,9% (Tabela 3). Esses resultados são semelhantes aos de Geraldo (2012), que encontraram uma percentual de 53,13% entre doadores de plaquetas por aférese, utilizando o mesmo título, mas através da técnica de gel-centrifugação.

A frequência de voluntários com Hemolisina Positiva entre os Grupos A, B e O foi de 21,1%, 45,5% e 78,9%, respectivamente. Adotando os critérios do NHSBT verificamos que a frequência de voluntários considerados Perigosos para esses mesmos grupos seria diferente utilizando a titulação de anticorpos. Considerando títulos maiores ou iguais a $1/128$ em TA, a frequência seria de 28,1%, 27,3% e 56,9% para os Grupos A, B e O respectivamente. Já com títulos maiores ou iguais a $1/256$ em AGH a frequência nesses voluntários seria de 12,3%, 9,1% e 74,1%, respectivamente.

A utilização de testes sensíveis na rotina imuno-hematológica é fundamental para seleção de hemocomponentes adequados para transfusão. Diversos estudos vêm comprovando esse aumento na sensibilidade da técnica gel-centrifugação e sua praticidade na rotina imuno-hematológica. Geraldo (2012) verificou que títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO ($\geq 1/64$) através da técnica de gel-centrifugação foram mais sensíveis e específicos que Pesquisa de Hemolisinas em tubo. No entanto, Voak (1999) relatou que a técnica em gel-centrifugação não foi capaz de detectar incompatibilidades de subgrupos ABO. Embora a técnica em tubo seja considerada padrão

outro, autores que realizaram a Pesquisa de Hemolisina através da técnica em microplaca, verificaram dentre 493 amostras de doadores brasileiros do grupo O, 41,58% de hemólise (CAMPOS *et al.*, 2009). Em nosso estudo, quando considerados críticos os títulos maiores ou iguais a 1/128 em TA, o percentual de amostras do Grupo O consideradas críticas (56,9%) (Tabela 3) foi semelhante ao encontrado por Campos e colaboradores (2009).

Não observamos boa concordância entre a Pesquisa de Hemolisinas ABO e os diferentes títulos críticos de anticorpos. No entanto, com os anticorpos Anti-B considerados críticos ($\geq 1/128$) na fase de AGH obtivemos moderada concordância. Ottoni e colaboradores (2010) não encontraram correlação significativa entre Hemolisinas ABO Positivas e títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO maiores que 1/100, ambas através da técnica em tubo em 588 doadores do Grupo O. Mathai e colaboradores (2003) avaliaram a correlação entre de Hemolisinas e títulos de Anti-A e Anti-B em TA e AGH com amostras do Grupo O, considerando o título crítico 1/64 com a destruição das IgM com DTT. Da mesma forma que em nosso estudo, os autores encontraram correlação somente com anti-B em AGH. Outros estudos que compararam a Pesquisa de Hemolisina e Títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO demonstram que os dois métodos podem ser utilizados na identificação de hemolisinas A e B (ARAVECHIA *et al.*, 2007). Khampanon e colaboradores (2012) encontraram correlação significativa entre o título de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e Hemolisinas Positivas. No entanto, os autores utilizaram títulos críticos de 1/64 tanto em TA quanto em AGH. Além disso, realizaram a técnica de destruição dos anticorpos IgM com DTT antes das reações com AGH (KHAMPANON, 2012). Outro estudo que não encontrou boa correlação entre títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e Pesquisa de Hemolisinas sugere o uso do método de hemólise como padrão, até que demais estudos sejam realizados e possam garantir o uso da titulação de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO para definir os doadores ("O" Perigoso) (CAMPOS *et al.*; 2009).

Observamos que na Fase II 73,2% dos voluntários não apresentaram alteração dos resultados de hemolisina, no entanto 19,5% passaram a ser considerados Hemolisina Positiva mesmo fazendo restrição no uso de produtos contendo probióticos. Não podemos afirmar se houve concordância entre a Pesquisa de Hemolisinas e títulos críticos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO nas Fases II e III, visto que estas fases estavam sob influência da restrição alimentar de

probióticos e do consumo dos iogurtes, respectivamente. No entanto, a frequência de amostras da Fase II que passaram a ser Hemolisina Positivas (19,5%) é semelhante àquela que apresentou aumento no título de anticorpos em TA e AGH, 17% e 22%, respectivamente.

É possível que o aumento de títulos em 22% das amostras da Fase II esteja relacionado com a presença de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO da classe IgG, visto que além desses, os anticorpos da classe IgM também são capazes de se fixar as proteínas do complemento presentes na membrana eritrocitária provocando assim a hemólise das hemácias (DANIELS, 2002; ROBACK *et al.*, 2008). Essa observação é reforçada quando analisamos as diferenças entre Pesquisa de Hemolisina e aumento de títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO com uso de AGH na Fase III. Dentre os 126 indivíduos 29,4% passaram a ser considerados Hemolisina Positiva, sendo que 25% (Figura 22) apresentaram títulos de anticorpos aumentados na Fase de AGH. Embora estudos relatem a eficácia dos probióticos em estimular o desenvolvimento dos anticorpos IgG (NG *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010; PÉREZ *et al.*, 2010), não podemos afirmar que a restrição ou o uso de probióticos podem proporcionar uma melhor concordância dos resultados entre Pesquisa de Hemolisinas e Títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO devido a ausência de testes estatísticos que confirmem esses resultados.

Embora tenhamos verificado que houve uma aumento nas frequências de Hemolisinas A e B após o uso de probióticos, não podemos afirmar que os probióticos foram responsáveis por esse aumento. Isto porque não há consenso na literatura quanto ao método (aglutinação ou hemólise) (ARAVECHIA *et al.*, 2007; COOLING, 2007; NOVARETTI, 2008).

Cooling (2007) destaca que a ausência de uma padronização da metodologia, assim como título crítico adotado na rotina laboratorial pode dificultar significativamente a disponibilidade de componentes plaquetários dos Hemocentros. Os estudos realizados também não levam em consideração o monitoramento de possíveis reações transfusionais que o paciente pode desencadear utilizando diferentes títulos e metodologias. Isso porque as Reações Hemolíticas por incompatibilidade menor são raras (COOLING, 2007).

Madza e colaboradores (2007) atribuíram as mudanças de títulos de anticorpos de Japoneses entre 1986 a 2005 devido a mudança cultural do país. Os autores chamam a atenção que durante esses anos o Japão passou a consumir produtos ocidentais, ou seja industrializados.

Essa comparação foi realizada com títulos de Laos e da Tailândia onde a alimentação ainda não é considerada tão industrializada pelo fato dos países estarem em desenvolvimento (MADZA *et al.*, 2007). Essa mesma observação de mudanças de títulos evidenciamos ao pesquisar títulos de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em publicações com doadores Nigorianos entre 2001 e 2011 (OLAWUKI & OLATUNJI, 2001; KAGU *et al.*, 2011). Pérez e colaboradores (2010) hipotetizou que não tenham sido observadas relações significativas do efeito de probióticos sobre as imunoglobulinas devido a melhora nas condições sanitárias do país, sendo que as crianças estão menos expostas a infecções intestinais acreditando-se que esse processo de infecção natural seja fundamental para o desenvolvimento do sistema imune (PÉREZ *et al.*, 2010).

As pesquisas com probióticos constituem uma área relativamente recente e em rápida expansão. No ano de 2009 estavam registradas 5466 publicações na base de dados *Pubmed*, das quais cerca de 30% sob forma de artigos de revisão. Comparativamente, na área dos antibióticos, estavam registradas 506.706 publicações, das quais 8% sob a forma de revisões. Assim, no contexto dos probióticos, verifica-se uma carência evidente de publicações com investigação científica original, principalmente aquelas que envolvam probióticos e Sistemas sanguíneos (GUERREIRO *et al.*, 2010).

7 CONCLUSÕES

A frequência dos fenótipos ABO dos 126 voluntários foi de 45% (57) para o grupo A, 9% (11) para o grupo B e 46% (58) para o grupo O. Não evidenciamos nenhuma amostra com anticorpos irregulares;

As amostras com anticorpos anti-A e Anti-B em TA apresentaram títulos na Fase I com maior prevalência de 1/32, sendo que em fase de AGH foi de 1/128 para ambos os anticorpos;

Durante o período de restrição de probióticos os títulos de maior prevalência para Anti-A e Anti-B em TA foram de 1/64 e 1/32, respectivamente. Em fase de AGH os títulos foram de 1/512 e 1/256 para Anti-A e Anti-B, respectivamente;

Após o consumo de probióticos os voluntários passaram a ter uma prevalência de títulos de Anti-A e Anti-B de 1/64 e 1/16, respectivamente. Em fase de AGH essa prevalência foi de 1/256 para ambos os anticorpos contra antígenos do Sistema ABO.

Os títulos Anti-B em TA reduziram significativamente após o consumo do probiótico.

Os títulos de Anti-A em AGH aumentaram significativamente após o consumo do probiótico.

O percentual de amostras consideradas com títulos críticos na Fase I em TA e em AGH foi de 32,5% e 40,5%, respectivamente de acordo com os critérios do NHSBT.

Na Fase III o percentual de amostras consideradas com títulos críticos em TA e em AGH foi de 34,9% e 50,8%, respectivamente de acordo com os critérios do NHSBT.

Entre os voluntários foi observada uma frequência de 49,2% de Hemolisinas Positivas na Fase I, 41,5% na Fase II e 41,7% após o consumo de probióticos.

Evidenciamos que 65,1% das amostras não apresentaram alteração nos resultados de hemolisina, 29,4% passaram a ser considerados Hemolisina Positiva e 5,6% passaram ser considerados Hemolisina Negativa após o consumo de probióticos.

Não se evidenciou relação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o pH fecal em nenhuma das fases do estudo.

Foi observada relação significativa entre a quantidade de bifidobactérias e o título de anticorpos Anti-B em AGH após o consumo de probióticos.

Foi observada relação significativa entre a Idade dos voluntários e títulos de anticorpos Anti-B em TA somente nas Fases I e III. Não

houve relação significativa entre a idade e anticorpos anti-A em nenhuma das fases.

Não observamos boa concordância dos resultados de Hemolisina e Títulos de Anticorpos contra antígenos do Sistema ABO.

8 BIBLIOGRAFIA

- ANSTEE, D. J. The relationship between blood groups and disease. **Blood**, v.115, n.23, p.4635-4643, 2010.
- ANTONELOU, M. H.; KRIEBARDIS, A. G.; STAMOULIS, K. E.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; MARGARITIS, L. H.; PAPASSIDERI, I. S. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. **Transfusion**, v. 50, n. 2, p.376-89, 2010.
- ARAVECHIA, M. G.; DEZAN, M. R.; BASTOS, E. P.; *et al.* Uma forma simples e eficaz de identificar hemolisinas A e B. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.29, p.339, 2007.
- BARJAS-CASTRO, M. L.; LOCATELLI, M. F.; CARVALHO, M. A.; GILLI, S. O.; CASTRO, V. Severe immune hemolysis in a group A recipient of a group O red blood cell unit. **Transfus Med**, v.85, n.3, p.213-215, 2003.
- BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIA, S. M. L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. **Arch latinoam nutr**, v.4, n.3, p. 293-297, 2004.
- BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do Sistema Sanguíneo ABO. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 25, p. 47-58, 2003.
- BERSÉUS O.; BOMAN, K.; NESSEN, S. C.; WESTERBERG, L. A. Risks of hemolysis due to anti-A and anti-B caused by the transfusion of blood or blood components containing ABO-incompatible plasma. **Transfusion**, v.53, p.114-123, 2013.
- BIOVATI, B.; MATTARELLI, P. The Family Bifidobacteriaceae. **Prokaryotes**, v. 3, p. 322-382, 2006.
- BORDIN, J. O.; JÚNIOR, D. M. L.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. Editora: Atheneu, São Paulo, 2007.
- BOYER, K. M., THEERAVUTHICHAJ, J., VOGEL, L. C., ORLINA, A., GOTOFF, S. P. Antibody response to group B streptococcus type 111 and AB blood group antigens induced by pneumococcal vaccine. **J Pediatr**, v.98, n.3, p.374-8, 1981.
- BRASIL. Resolução ANVISA - RDC N° 153, de 14 de junho de 2004. **Diário Oficial da União**. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o

uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, ANVISA, 2007.

BRASIL (a). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Hemovigilância nº 2** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, ANVISA, 2009.

BRASIL (b). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Guia para o uso de hemocomponentes** / Ministério da Saúde. Brasília, MS, 2009.

BRASIL. Resolução ANVISA - RDC Nº 57, de 16 de dezembro de 2010. **Diário Oficial da União**. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais.

BRASIL (a). Portaria Ministerial Nº 1353, de 13 de junho de 2011. **Diário Oficial da União**. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos.

BRASIL (b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Hemovigilância nº 4** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, ANVISA, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Hemovigilância nº 5** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, ANVISA, 2012.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; VICAUT, E.; NEUT, C.; FLOURIE, B.; BROUNS, F.; BORNET, F. R. The capacity of non digestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobactéria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6, p. 1658-1664, 2004.

BURIGO, T.; FAGUNDES, R. L. M.; TRINDADE, E. B. S. M.; VASCONCELOS, H. C. F. F.. Efeito bifidogênico do fruto-oligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 2007.

CAMPOS, S. A.; CANOS, S. M. U.; DOS SANTOS, N. A. P.; *et al.* Correlação entre hemólise e título de anti-A e anti-B em doadores de sangue em Serviço de Hematologia e Hemoterapia de São José dos

Campos (SHHSJC). **Rev Bras Hematol Hemoter**, s.5, v.31, p.340-341, 2009.

CAMPOS, L.; CANTO, D.; CAMPOS, R.; JUCKOWSKY, C.; BALSAN, A.; PETERSEN, V. Transfusão de concentrado de hemácias A2 em receptor do Grupo sanguíneo B. **Rev Bras Hematol Hemoter**, s.4, v.32, p.304, 2010.

CARVALHO, E. G.; UTIYAMA, S. R. R.; KOTZE, L. M. S.; REASON, I. T. M. Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 30, n.5, p.187-193, 2007.

CASTRO, A. A.; CARVALHO, S. M. R. Projeto de Pesquisa (parte VIII – Método Estatístico / Tamanho da Amostra). In: CASTRO, A. A. **Planejamento da Pesquisa**, São Paulo. Editora AAC, 2001.

CEBRA, J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **Am J Clin Nutr**, p. 1046-1051, 1999.

COBOSANZ, J. M.; MATEOS, J. A.; MUÑOZCONEJO, A. Efecto de *Lactobacillus casei* sobre la incidencia de procesos infecciosos en niños/as. **Nutr Hosp**, v.21, n.4, p.547-551, 2006.

COOLING, L. ABO and platelet transfusion therapy.

Immunohematology, v. 01 n.23, p.20-33, 2007.

COOLING, L.; DOWNS, T. A.; BUTCH, S. H.; DAVENPORT, R. D. Anti-A and anti-B titers in pooled platelets are comparable to apheresis platelets. **Transfusion**, v.48. n.10, p.2106-13, 2008.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciênc. Rural**, v.34, n.4, p. 1297-1303, 2004.

COSECHEN, V. S.; MONTEIRO, M. C. Frequência de Aglutininas Anti-a e Anti-b nos Doadores de Sangue do Grupo “o” do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Guarapuava/PR2008). **Rev Bras Cienc Saude**, n. 01, v.3, p.39-48, 2008.

COSTA, F. P. S.; ROSA, E. S.; FELIPE, L. F.; MELO, C. M. T. P.; MELO, D. B. Estudo da influência de fatores raciais na produção de hemolisinas em altos títulos por doadores tipo O do Serviço de Hematologia e Hemoterapia de São José dos Campos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, s. 2, v. 27, p. 354-355, 2005.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; , ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v.50, n.4, p.434-61, 2010.

DANIELS, G. **Human Blood Groups**. Oxford, Blackwell Science, 2th edition; p. 7-98, 2002.

DANIEL-JOHNSON, J.; LEITMAN, S.; KLEIN, H.; ALTER H.; LEE-STROKA, A.; SCHEINBERG, P.; PANTIN, J.; QUILLEN, K.

Probiotic-associated high-titer anti-B in a group A platelet donor as a cause of severe hemolytic transfusion reactions. **Transfusion**, v.49, p. 1845-1849, 2009.

DAVE, D. A.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **Int Dairy**, v.7, p. 31-41, 1997.

DE BARTOLO, M.; GIORDANO, F.; VIOLANTE, A.; BONOMI, P. Laboratory tests applied to transfusion problems. Identification of dangerous universal donors and their frequency. **Ann Sclavo**, v.19, n.5, p.1092-102, 1977.

DELANEY, M.; WARNER, P.; NELSON, K.; GLECKLER, C.; PRICE, T.; MADELEINE, M. Humoral immunomodulatory effect of influenza vaccine in potential blood donors: implications for transfusion safety. **Transf Med**, v.21, p. 378-384, 2011.

EBERT, R. V.; EMERSON, C. P. A clinical Study of Transfusion reactions: the hemolytic effect of group-O blood and pooled plasma containing incompatible isoagglutinins. **J Clin Invest**, n.04, v.25, p.627-638, 1946.

ERHABOR, O.; ADIAS, T. C. **Transfusion Medicine Made Easy for Students of Allied Medical Sciences and Medicine**. Editora InTech. 2012.

FERNANDES, V. C.; BARGATTO, A. F.; FILHO, S. B.; TOLEDO, M. I.; LOPES LC. Frequência de hemolisinas anti-A e Anti-B em doadores de sangue de Itapeva e Ourinhos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, n.6, v.30, p.453-456, 2008.

FRANÇA, N. G.; POLI, M. C.; RAMOS, P. G.; BORSOI, C. S.; COLELLA, R. Titers of ABO antibodies in group O blood donor s. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.33, n.4, p.259-62, 2011.

FUNG, M. K.; DOWNES, K. A.; SHULMAN, I. A. Transfusion of Platelets Containing ABO-Incompatible Plasma: A Survey of 3156 North American Laboratories. **Arch Pathol Lab Med**, v. 131, p.909-916, 2007.

GAMBERO, S.; SECCO, V. N. D. P.; FERREIRA, R. R.; DEFFUNE, E.; MACHADO, P. E. A. Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. **Rev Bras Hematol Hemoter**, n. 01, v. 26, p.28-34, 2004.

GERALDO, A. **Comparação entre as técnicas de Hemolisina em Tubo e Titulação de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO em Gel-centrifugação.** Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade do Sul de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

GARRO, M. S.; AGUIRRE, L.; GIORI, G. S. Biological activity of *Bifidobacterium longum* in response to environmental pH. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 70, p. 612–617, 2005.

GUERREIRO, A. S.; FERREIRA, G. C.; CREMERS, M. I. **Probióticos em Medicina Geral Aplicações na Área Gastreenterológica – Monografias Clínicas.** Editora SPED, 2010.

GIRELLO, A. L.; KÜHN, T. I. B. B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária.** São Paulo, Editora: Senac, 3^a edição, 2011.

HARRIS, S. B.; JOSEPHSON, C. D.; KOST, C. B.; HILLYER, C. D. Nonfatal intravascular hemolysis in a pediatric patient after transfusion of a platelet unit with high-titer anti-A. **Transfusion**, v.47, p.1412-1417, 2007.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p.374-379, 2001.

HENRICHS, K. F.; HOWK, N.; MASEL, D. S.; THAYER, M., REFAAI, M. A, KIRKLEY, S. A, HEAL, J. M, BLUMBERG, N. Providing ABO-identical platelets and cryoprecipitate to (almost) all patients: approach, logistics, and associated decreases in transfusion reaction and red blood cell alloimmunization incidence. **Transfusion**, v.52, p.635–640,2012.

HOFFMAN, R.; BENZ Jr, E. J.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; Silberstein, L. E.; MCGLAVE, P. **Hematology: Basic Principles and Practice**, 3 ed, 2000.

ISAAK, E. J.; TCHORZ, K. M.; LANG, N.; KALAL, C.; KHALIFE, G.; SMITH, D.; MACCARTHY, M. C. Challenging dogma: group A donors as “universal plasma” donors in massive transfusion protocols. **Immunohematology**, v. 27, n. 2, p.61-65, 2011.

JAHREIS, G.; VOGELSANG, H.; KIESSLING, G.; SCHUBERT, R.; BUNTE, C.; HAMMES, W. P. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillusparacasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. **Food Res Int**, v. 35, p.133-138, 2002.

JUDD, W. J.; JOHNSON, S. T.; STORRY, J. R. **Judd’s Methods in Immunohematology**, AABB Press, 3rd Ed, Bethesda, p. 557-559, 2008

- JULMY, F.; ACHERMANN, F.;SCHULZKI, T.; CARREL, T.; NYDEGGER, U. PLTs of Blood Group A1 donors express increased surface A antigen owing to apheresis and prolonged storage. **Transfusion**,v.43, p.1378-1385, 2003.
- JULMY, F.; AMMANN, R. A.; TALEGHANI, B. M.; FONTANA, S.; HIRT, A.; LEIBUNDGUT, K. Transfusion efficacy of ABO major-mismatched platelets (PLTs) in children is inferior to that of ABO-identical PLTs.**Transfusion**, n. 3, v.49, p.21-33, 2009.
- JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. A história da hemoterapia do Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, n. 03, v. 27, p.201-207, 2005.
- KAGU, M. B.;AHMED, S. G.; MOHAMMED, A. A.; MOSHOOD, W. K.; MALAH, M. B.;KEHINDE, J. M.Anti-A and Anti-B Haemolysins amongst Group “O” VoluntaryBlood Donors in Northeastern Nigeria. **J Transf**, p.1-3, 2011.
- KHAMPANON, K.; CHANPRAKOP, T.; SRIWANITCHRAK, P.; SETTHAKARN, M.; OOTA, S.; NATHALANG, O. The characteristics of ABO antibodies in group O Thai blood donors. **J Clin Lab Anal**, v. 26, n. 4, p.223-6, 2012.
- KOBAYASHI T.; SAITO K.A series of surveys on assay for anti-A/B antibody by Japanese ABO-incompatible. **Xenotransplantation**, v.13, p.136-140, 2006.
- KOCHHAR, P. K. **Blood Transfusion in Clinical Practice**. Editora Intech, 2012.
- KOSKELA, P.; NURMI, T.; HIIVIL, V. IgA, IgG and IgM anti-blood group A antibodies induced by pneumococcal vaccine. **Vaccine**, v. 8, p.221-222, 1988.
- KRIEBARDIS, A. G.; ANTONELOU, M.H.; STAMOULIS, K. E.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; MARGARITIS, L. H.; PAPASSIDERI, I. S. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components.**Transfusion**, v. 48, n. 9, p.1943-53, 2008.
- KULKARNI, A. G.; IBAZEBE, R.; FLEMING, A.F. High frequency of anti-A and anti-B haemolysins in certain ethnic groups of Nigeria. **Vox Sang**, Abstract.v.48, n.1, p.39-41, 1985.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p.159-174, 1977.
- LEVINE, P.; MABEE, J.A. Dangerous "universal donor" detected by the indirect matching of bloods. **J Immunol**, v.8, p.425-431, 1923.

- MACEDO, R. E. F.; PFLANZER, J. S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciênc Tecnol Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 3, p.509-519, 2008.
- MÄKIVUOKKO, H.; LAHTINEN, S. J.; WACKLIN, P.; TUOVINEN, E.; TENKANEN, H.; NIKKILÄ, J.; BJÖRKLUND, M.; ARANKO, K.; OUWEHAND, A. C.; MÄTTÖ, J. Association between the ABO blood group and the human intestinal microbiota composition. **Microbiology**, Jun, n.6; p.12:94, 2012.
- MATHAI, J.; SINDHU, P. N.; SULOCHANA, P. V.; SATHYABHAMA, S. Haemolysin test for characterization of immune ABO antibodies. **Indian J Med Res**, v. 118, Sep. p 125-128, 2003.
- MATTOS, L. C.; SANCHEZ, F. E.; CINTRA, J. R.; SALLES, A. B. C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; MOREIRA, H. W. Genotipagem do locus ABO (9q34.1) em doadores de sangue da região noroeste do Estado de São Paulo. **Rev. Bras Hematol Hemoter**, v.23, n.01, p.5-22, 2001.
- MAZDA T, YABE R, NATHALANG O, THAMMAVONG T, TADOKORO K. Differences in ABO antibody among blood donors: a comparison between past and present Japanese, Laotian and Thai populations. **Immunohematology**, v.23, n.01, p.38-41, 2007.
- MUÑO A, F. J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, n. 7, p. 1715-1718, 1988.
- MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in Clinical Medicine**. Oxford, Blackwell Science, 11th edition; p.114-162, 2005.
- NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S. C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**, v.15, n.2, p.300-10, 2009.
- NOVARETTI, M. C. Z. Hemolisinas anti-A e anti-B na prática transfusional. **Rev Bras Hematol Hemoter**, n.06, v. 30, p. 433-436, 2008.
- OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **J Med Microbiol**, v.300, p.57–62, 2010.
- OLAWUMI, H. O.; OLATUNJI, P. O. Prevalence and titre of alpha and beta haemolysins in blood group 'O' donors in Ilorin. **Afr J Med MedSci**, v.30, n.4, p.319-21, 2001.

- OLIVEIRA, M. C. V. C.; GÓES, S. M. P. M. **Práticas em Imunohematologia Eritrocitárias**. São Paulo, Editora: Medsi, p.150-153, 1999.
- OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciênc.Tecnol. Aliment**, s.23, dez, p.172-176, 2003.
- OKAFOR, L. A.; ENEBE, S. Anti-A and anti-B haemolysins, dangerous universal blood donors and the risk of ABO antagonism in a Nigerian community. **Trop Geogr.Med**, Abstract, v.37, n. 3, p.270-2, 1985.
- OMG. Organização Mundial de Gastroenterologia. **Guias Práticos da OMGE: Probióticos e Prebióticos**. 2008.
- ORBAN, J. I.; PATTERSON, J. A. Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobactérias. **J Microbiol Methods**, v. 40, p. 221-224, 2000.
- OTTONI, E. L.; CAMPOS, L.; PETERSEN, V.; SEKINE, L.; BORSATO, L. F.; MESKO, J.; ROSA, A. D.; PAIM, P.; FOCESATTO, L.; BALSAN, A. M.; ONSTEN, T. Prevalência de hemolisinas e títulos de aglutininas em doações de sangue no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Rev Bras Hematol Hemoter**, s.4, v.32, p.300, 2010.
- PAN, S. J.; KUO, C. H.; LAM, K. P.; CHU, Y. T.; WANG, W. L.; HUNG, C. H. Probiotics and allergy in children--an update review. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 4, n.21 p.659-66, 2010.
- PÉREZ N.; IANNICELLI JC.; GIRARD-BOSCH C.; GONZÁLEZ S.; VAREA A.; DISALVO L.; APEZTEGUIA M.; PERNAS J.; VICENTIN D.; CRAVERO R. Effect of probiotic supplementation on immunoglobulins, isoagglutinins and antibody response in children of low socio-economic status. **Eur J Nutr**, v.49, p.173–179, 2010.
- PERRY, H. E.; FRANKLIN, R. A.; BRAY, S. J.; LO, M. K.; SVENSSON, L. A. C.; HENRY, S. M. A novel study of association between *Neisseria gonorrhoeae* and the human carbohydrate blood groups. **Immunohematology**, v.23, n.03, p.100–104, 2007.
- PIERCE, R. N.; REICH, L. M.; MAYER, K. Hemolysis following platelet transfusions from ABO-incompatible donors. **Transfusion**, v.25, p.60–62, 1985.
- POLK, J. M. A clinical study of the hemolytic action of human blood serum. **J Med Res**, n. 03, v.XII, p.265-293, 1904.
- REFAAI, M. A.; FIALKOW, L. B.; HEAL, J. M. HENRICH, K. F.; SPINELLI, S. L.; PHIPPS, R. P.; MASEI, E.; SMITH, B. H.; CORSETTI, J. P.; FRANCIS, C. W.; BANKEY, P. E.; BLUMERG, N.

- An association of ABO non-identical platelet and cryoprecipitate transfusions with altered red cell transfusion needs in surgical patients. **Vox Sang**, n.101, p.55–60,2011.
- REIS, M. D.; COOVADIA, A. S. Transfusion of ABO-incompatible platelets causing severe haemolytic reaction. **Clin Lab Haematol**, v.11, p.237–240, 1989.
- ROBACK, J. D.; COMBS, M. R.; GROSSMAN, B. J.; HILLYER, C. D. **Technical Manual: Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide**. American Association of Blood Banks, Bethesda, 16th Edition, 2008.
- ROSE, C. S.; KUHN, R.; ZILLIKEN, F.; GYORGY, P. Bifidusfactor.V. The activity of alpha- and-beta-methyl-N-acetyl-D-glucosaminides. **Arch Biochem Biophys**, v.49, n.1, p.123-9, 1954.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev Bras Cienc Saude**, n.01, v.42, p. 1-16, 2006.
- SANDES, A. F.; SZULMAN, A.; LINO, F. L.; SANJURJO, M. A.; COSTA, T. H.; SIMÃO, H. M. R.; SIEDSCHLAG, A. C.; CARVALHO, F. O.; GONÇALVES, M. G.; BARRETO, J. A. Detecção de unidades de plaquetas por aférese do tipo O com altos títulos de isoaglutininas anti-A e anti-B e definição de título crítico seguro para transfusão. **Rev Bras Hematol Hemoter**, s.3, v.29, p.381, 2007.
- SANTOS, E. F. G. D.; AZEVEDO, A. C. M.; BORGES, M. B. Análise e titulação de doadores do grupo “O” do Banco de Sangue de Ourinhos (SP). **Rev Bras Hematol Hemoter**, s.4, v.30, p.306, 2008.
- SCARDOVI, V. **Genus Bifidobacterium**. In: BERGEY’S manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 1418-1434, 1986.
- SCHENKEL-BRUNNER, H. Human Blood Groups. **Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity**. Springer Wien New York. Second Edition, 2000.
- SILVA M. L.; FERNANDES, M.; GUASTI, G.; DUARTE, M. E.; CASTILHO, S. Pesquisa de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemorio. **Rev Bras Hematol Hemoter**, s.2, v.28, p.272, 2006.
- SIMON, T.; SNYDER, E. L.; SOLHEIM, B. G.; STOWELL, C. P.; STRAUSS, R. G.; PETRIDES, M. **Rossi’s principles of transfusion medicine**. 4th ed. 2009.
- SHAH, N.P.; ALI, J.F.; RAVULA, R.R. Populations of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus casei* in

commercial fermented milk products. **Biosci Microflora**, v. 19, n.1, p. 35-39, 2000.

SKOGSBERG (a), U.; BREIMER, M. E.; FRIMAN, S.; MJÖRNSTEDT, L.; MÖLNE, J.; OLAUSSON, M.; RYDBERG, L.; SVALANDER, C. T.; BÄCKMAN, L. Successful ABO-incompatible liver transplantation using A2 donors. **Transplant Proc.** n. 08, v.38, p.2667-2670, 2006.

SKOGSBERG (b), U.; BREIMER, M. E.; FRIMAN, S.; MJÖRNSTEDT, L.; MÖLNE, J.; OLAUSSON, M.; RYDBERG, L.; SVALANDER, C. T.; BÄCKMAN, L. Adult ABO-incompatible liver transplantation, using A2 and B donors. **Xenotransplantation**, n. 12, p. 154–159, 2006.

SPRINGER, G. F.; HORTON, R. E.; FORBES, M. Origem of Anti-Human Blood Group B agglutinins in white Leghorn Chicks. **J Exp Med**, v.110, n.2, p.221–244, 1959.

SPRINGER, G. F.; WILLIAMSOM, P.; BRANDES, W. C. Blood Group Activity of Gram-Negative bacteria. **J Exp Med**, v.113, n.6, p.1077-93, 1961.

SPRINGER, G. F.; HORTON, R. E. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. **J Clin Invest**, v.48, p.1280-1291, 1969.

STAUBACH, F.; KÜNZEL, S.; BAINES, A. C.; YEE, A.; MCGEE, B. M.; BÄCKHED, F.; BAINES, J. F.; JOHNSEN, M. Expression of the blood-group-related glycosyltransferase B4galnt2 influences the intestinal microbiota in mice. **ISME J**, v.6, n.7, p.1345–1355, 2012.

STOWELL, S. R.; ARTHUR, C. M.; DIAS-BARUFFI, M.; RODRIGUES, L. C.; GOURDINE, J. P.; HEIMBURG-MOLINARO, J.; JU, T.; MOLINARO, R. J.; RIVERA-MARRERO, C.; XIA, B.; SMITH, D. F.; CUMMINGS, R. D. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nat Med**, v.16, n.3, p.295-301, 2010.

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. **Saúde Amb Rev**, n.01, v.03, p. 16-33, 2008.

STORRY, J. R.; OLSSON, M. L. The ABO blood group system revisited: a review and update. **Immunohematology**, n. 02, v.25, p.48-59, 2009.

TABASUM, S. T.; NAYAK, R. P. Salivary blood group antigens and microbial flora. **Int J Dent Hygiene**, v.9, p. 117–121, 2011

TASAKI, T.; SATOH, S.; GOTOH, K.; FUJII, K.; SASAKI, S.; TAKADATE, J.; TACHIBANA, M.; ONO, Y.; ISHIDA, Y.

- Transfusion-related problems following major ABO-incompatible bone marrow transplantation. **Transf Apher Sci**, v. 28, p. 155-161, 2003.
- TOVEY, A. D. The incidence, distribution and lifehistory of the anti-A and anti-B haemolysins in the general population; an investigation of 90,000 blood samples. **Vox Sang**, Abstract.v.3, n.5, p.363-74, 1958.
- TURCHET, P.; LAURENZANO, M.; AUBOIRON, S.; ANTOIN, E. J. M. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. **J Nutr Health Aging**, n.2, v. 7, p. 75-77, 2003.
- UCHIDA, H.; KINOSHITA, H.; KAWAI, Y.; KITAZAWA, H.; MIURA, K.; SHIIBA, K.; HORII, A.; KIMURA, K.; TAKETOMO, N.; ODA, M.; YAJIMA, T.; SAITO, T. Lactobacilli binding human A-antigen expressed in intestinal mucosa. **Res Microbiol**, v.157, p. 659–665, 2006.
- VICENTE, M.; MASCARENHAS, A. C. T. S.; LOCATELLI, M. F.; BASTONE, P. R. G.; BARJAS-CASTRO, M. L. Titers of isohemagglutinin anti-A and anti-B have increased during the past 15 years. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.33, n.2, p.343, 2011.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus* and lactic starter in fermented dairy products. **Int. Dairy J**, v.10, p.271-275, 2000.
- VOAK, D. The status of new methods for the detection of red cell agglutination. **Transfusion**, v.39, n. 10, p. 1037-1040, 1999.
- WACKLIN, P.; MÄKIVUOKKO, H.; ALAKULPPI, N.; NIKKILA, J.; TENKANEN, H.; RÄBINÄ, J.; PARTANEN, J.; ARANKO, K.; MÄTTO, J. Secretor Genotype (FUT2 gene) Is Strongly Associated with the Composition of Bifidobacteria in the Human Intestine. **Plos One**, May, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2011.
- WILPERT, J.; GEYER, M.; TESCHNER, S.; SCHAEFER, T.; PISARSKI, P.; SCHULZ-HUOTARI, C.; GROPP, A.; WISNIEWSKI, U.; GOEBEL, H.; GERKE, P.; WALZ G, DONAUER J. ABO-incompatible kidney transplantation-proposal of an intensified apheresis strategy for patients with high initial isoagglutinine titers. **J Clin Apher**.v.22, n. 6, p.314-22, 2007.
- WHO - World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO): Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk

and live lactic bacteria. Disponível

em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> 2001. Acesso em 02/02/2013.

WU, A. M.; WU, J. H.; SINGH, T.; LIU, J. -H.; TSAI, M. -S.; GILBOA-GARBER, N. Interactions of the fucose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-IIL, with mammalian glycoconjugates bearing polyvalent Lewis and ABH blood group glycotopes. **Biochimie**, v.88, p.1479–1492, 2006.

WIN, N. High Titre Anti-A/B Testing of Donors within NHS Blood and Transplant (NHSBT). **Clinical Guidelines and Policies from NHSBT**. Disponível em: <http://hospital.blood.co.uk/library/pdf/INF178.pdf>. Acesso em jan/2012.

YAMAMOTO, F. Review: ABO blood group system - ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. **Immunohematology**, n. 01, v. 20, p.3-22, 2004.

YAZER, M. H.; RAVAL, J. S.; TRIULZI, D. J.; BLUMBERG, N. ABO-mismatched transfusions are not over-represented in febrile non-haemolytic transfusion reactions to platelets. **Vox Sang**, n.102, p.175–177, 2012.

ZILLIKEN F (a), SMITH PN, ROSE CS, GYORGY P. Synthesis of 4-O-beta-D-galactopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamine by intact cells of *Lactobacillus bifidus* var. pennsylvanicus. **J Biol Chem**, v. 217, n. 1, p.79-82, 1955.

ZILLIKEN F (b), ROSE CS, BRAUN GA, GYORGY P. Preparation of alkyl N-acetyl-alpha and -beta-D-glucosaminides and their microbiological activity for *Lactobacillus bifidus* var. Penn. **Arch Biochem Biophys**, v.54, n. 2, p.392-7, 1955.

9 APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
CEP.: 88040-970 – FLORIANÓPOLIS – SC



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Avaliação do efeito de probióticos sobre o título de anticorpos do sistema ABO.

Prezado voluntário,

Esta pesquisa faz parte do projeto de mestrado do mestrando Alexandre Geraldo do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, orientado pela Profa. Dra. Flávia Martinello. Este estudo tem como objetivo verificar os efeitos de probióticos, na forma de iogurte, sobre os anticorpos do Sistema ABO, ou seja, verificar se os probióticos são capazes ou não de aumentar a quantidade de anticorpos nos humanos.

Os probióticos são microrganismos vivos presentes em alimentos que conferem benefícios à saúde de indivíduos que fazem uso destes em quantidade adequadas. Estudos vêm demonstrando que probióticos são capazes de aumentar a resposta imune (aumentando a quantidade de anticorpos) de indivíduos que fazem uso desses produtos rotineiramente. A presença de grande quantidade de anticorpos contra antígenos do Sistema ABO na bolsa de sangue do doador pode causar Reações Transfusionais como hipotensão arterial, tremores, dor lombar e insuficiência renal aguda no receptor de sangue.

A sua participação no estudo consistirá em ser submetido a um questionário de triagem, e se atender aos requisitos mínimos será realizada a coleta da primeira amostra de sangue e fezes no período inicial do estudo para a realização da Tipagem Sanguínea, Pesquisa de Anticorpos Irregulares, Titulação de Anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e quantificação de bifidobactérias, respectivamente. Após 3 meses sem consumir qualquer produto que contenha probióticos, você será submetido a uma segunda coleta de sangue e fezes para realizar novamente os exames de Titulação de Anticorpos contra antígenos do Sistema ABO e quantificação de bifidobactérias, respectivamente. Após esse período você receberá gratuitamente dos pesquisadores 1 (um) iogurte por dia para ser consumido em jejum pela manhã durante 1 (um) mês. Após completar os 30 dias, será

realizada a terceira coleta de amostra de sangue e fezes para a execução dos mesmos exames anteriores. Os exames realizados com amostras de sangue serão realizados no Hemocentro Regional de Blumenau (HEMOSC) e os de fezes no laboratório de Gestão da Qualidade no Departamento de Análises Clínicas da UFSC.

Estando de acordo em participar, garantimos que os resultados serão confidenciais e só serão utilizados nesta pesquisa.

Eu,.....
 ., portador do documento de identidade (RG) n°....., concordo que meus dados sejam utilizados na realização desta pesquisa. Declaro que fui esclarecido(a) sobre a pesquisa Avaliação do efeito de probióticos sobre o título de anticorpos do sistema ABO. Declaro ainda que fui esclarecido(a) de que a participação na pesquisa não me trará prejuízos ou despesas, contudo, poderá contribuir para o conhecimento científico, e que recebi uma cópia desse Termo. Sei que a qualquer momento posso deixar de participar desta pesquisa, através de contato com os pesquisadores, retirando o consentimento, sem que seja atribuída qualquer obrigação de ressarcimento e/ou obrigações aos pesquisadores, sem precisar haver justificativa e sem penalização,.

Florianópolis, de de 2011.

Assinatura do participante:

Antecipadamente agradecemos à colaboração.

Profª. Dra. Flávia Martinello

e-mail: flaviamartinello@ccs.ufsc.br

telefones (48)37219712 ramal 227

(48)99380414

Alexandre Geraldo

xandefarma@yahoo.com.br

(47)3237-3013 ou (47)99978014

10 APÊNDICE 2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
CEP.: 88040-970 – FLORIANÓPOLIS – SC
Questionário**



Nome Completo: _____

CPF: _____

RG: _____

Endereço: _____ **no** _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____

Telefone para Contato: _____

E-mail: _____

Questionário

1) Perdeu peso recentemente sem motivo aparente ou fez dieta nos últimos 3 meses?

R: _____

2) Apresentou quadro de febre, diarreia e/ou vômitos nos últimos 3 meses?

R: _____

3) Faz uso de pré e/ou probióticos ou antibióticos nos últimos 3 meses?

R: _____

4) Faz uso de algum desses produtos? Quando utilizou a última vez? Desde quando utiliza?

Nome da Marca	Fabricante
Activia	Danone
Activia Frozen	Danone
Activia Sobremesa	Danone
Batavinho	Batavo
Batavito	Batavo
Batavito Banda	Batavo
Batavito Mega	Batavo
Becel Pro-Activ	Becel
Bifiene Align Howaru Bifido	Chr. Hansen Yakult Procter e Gamble Danisco Morinaga Milk Industry
Iogurtes BioRich	Mil Grãos
Bio K+	Bio K+ Internacional
Biofibras	Batavo
Bioflorin Mutaflor DanActive Actimel Cultura	Cerbios-Pharma Ardeypharm Chr. Hansen Danone Arla Foods
Bob Esponja	Batavo
Chamyto	Nestlé
Danito	Danone
Danoninho com lactobacilos	Danone
Danup	Danone
Enterogermina	Sanofi-aventis
FemDophilus	Chr. Hansen
Fibermais	Nestlé
Foodcutes	
Hilline	Yakult
LC1	Nestlé
Ninho Solei	Nestlé

Retueri	BioGaia Biologics
Iogurtes SamBios	Santa Clara
Queijos SamBios	Santa Clara
Sobremesas e Iogurtes Alpro Soya	Alpro Soya
Sofyl Sobremesa	Yakult
Verum	Norrmejerier
Vifit	Valio
Vig	Vigor
Yakult	Yakult
Yakult 40	Yakult

R: _____

5) Fez tratamento algum tratamento para vômitos/diarréia nos últimos 3 meses? Qual medicamentos utilizou?

R: _____

6) Tomou alguma vacina recentemente? Qual?

R: _____

7) Usou algum medicamento recentemente? Qual? Quando?

R: _____

8) Tem alergia? A que?

R: _____

9) Possui diagnóstico de alguma doença auto-imune?

R: _____

11) Possui diagnóstico de Diabetes?
R: _____

12) Possui alergia a iogurtes?
R: _____

13) Possui intolerância a lactose?
R: _____

14) Faz uso de algum medicamento/suplemento na forma de comprimido ou cápsula?
R: _____

Afirmo que todas informações respondidas neste formulário são verídicas.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

11 APÊNDICE 3



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE
CEP.: 88040-970 – FLORIANÓPOLIS – SC
INSTRUÇÕES**



Este documento tem como objetivo instruir e sanar dúvidas dos voluntários na pesquisa.

Para que haja confiabilidade nos resultados deste estudo é necessário que o voluntário siga corretamente essas informações durante todo o período da pesquisa. Caso algum item abaixo não possa ser cumprido durante o estudo, ou que acidentalmente ocorra uma dessas situações abaixo o pesquisador deve ser informado imediatamente.

- Não deve ser iniciado nenhum regime para emagrecimento ou regime para ganho de peso e/ou massa muscular durante o estudo.
- Caso o voluntário apresente quadro de febre, vômito e/ou diarreia o pesquisador deve ser informado.
- Caso o voluntário inicie tratamento utilizando antibióticos o pesquisador deve ser informado.
- No caso do voluntário receber alguma vacina o pesquisador deve ser informado.
- Se durante o período de pesquisa o voluntário consumir produtos contendo probióticos e/ou prebióticos e por engano e/ou esquecimento, o pesquisador deve ser informado.
- Caso o voluntário tenha dúvidas do que pode ser ingerido, qualquer momento poderá entrar em contato com o pesquisador para sanar a dúvida.
- A rotina de alimentação (exceto as restritas já mencionadas), exercícios físicos, hábitos alimentares, etc devem ser mantidos pelos voluntários.
- Se possível evitar o consumo também de iogurtes sem probióticos.
- Medicamentos como Paracetamol, Dipirona Sódica, Anticoncepcional, AAS, anti hipertensivos, podem ser utilizados sem que haja prejuízo a pesquisa. Caso o voluntário tenha dúvidas de outros medicamentos consulte o pesquisador.
- Caso o voluntário iniciar tratamentos a base de suplemento alimentares, cápsulas, medicamentos fitoterápicos, o pesquisador deve ser informado.
- Lista de produtos que não podem ser utilizados durante o estudo:

Nome da Marca	Fabricante
Activia	Danone
Activia Frozen	Danone
Activia Sobremesa	Danone
Batavinho	Batavo
Batavito	Batavo
Batavito Banda	Batavo
Batavito Mega	Batavo
Becel Pro-Activ	Becel
Bifiene Align Howaru Bifido	Chr. Hansen Yakult Procter e Gamble Danisco Morinaga Milk Industry
Iogurtes BioRich	Mil Grãos
Bio K+	Bio K+ Internacional
Biofibras	Batavo
Bioflorin Mutaflor DanActive Actimel Cultura	Cerbios-Pharma Ardeypharm Chr. Hansen Danone Arla Foods
Bob Esponja	Batavo
Chamyto	Nestlé
Danito	Danone
Danoninho com lactobacilos	Danone
Danup	Danone
Enterogermina	Sanofi-aventis
FemDophilus	Chr. Hansen
Fibermais	Nestlé
Foodcutes	
Hillline	Yakult
LC1	Nestlé
Ninho Solei	Nestlé
Retueri	BioGaia Biologics
Iogurtes SamBios	Santa Clara
Queijos SamBios	Santa Clara
Sobremesas e Iogurtes Alpro Soya	Alpro Soya

Sofyl Sobremesa	Yakult
Verum	Norrmejerier
Vifit	Valio
Vig	Vigor
Yakult	Yakult
Yakult 40	Yakult

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pré-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 1768

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR-59 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regulamento Interno do CEPSH, CERTIFICA que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

APROVADO

PROCESSO: 1768 FR: 402086

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROBIÓTICOS SOBRE O TÍTULO DE ANTICORPOS DO SISTEMA ABO

AUTOR: Flávia Martinello, Alexandre Geraldo

FLORIANÓPOLIS, 28 de Março de 2011.

Coordenador do CEPSH UFSC

Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador do CSD/PPG-UFSC